

Занятие семинарского типа № 7

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Технологические схемы производства белков. Рекомбинантные белки

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Общая характеристика микробиологического способа получения белка

Преимущества микробиологического синтеза белка заключаются в следующем:

- ✓ микроорганизмы обладают высокой скоростью накопления биомассы (до 5000 раз большей, чем у животных или растений);
- ✓ микробные клетки способны накапливать значительное количество белка;
- ✓ при биотехнологическом получении белка отсутствует многостадийность за счет высокой специфичности;
- ✓ биосинтез белка осуществляется в мягких условиях;
- ✓ биотехнологический способ получения белка менее трудоемок по сравнению с процессом его органического синтеза.

В настоящее время биотехнологическое производство белка является самым крупномасштабным производством. Так, в 2001 г. на 15 биотехнологических предприятиях произведено свыше 90 тыс. т. кормового микробиологического белка.

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, структурные, запасные, защитные и др. Для образования клеток и тканей организма, а также для поддержания его жизненных функций должен осуществляться постоянный синтез структурных и других форм белков. В состав белков входят 20 аминокислот и 2 амида (аспарагин и глутамин).

Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ (углекислоты, воды и минеральных солей), тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты продуктов питания. Такие аминокислоты называют незаменимыми. К ним относятся: валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин и др. Отсутствие в пище хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность сельскохозяйственных животных. Главным источником незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав продуктов питания, а для сельскохозяйственных животных – главным образом, растительные белки.

Белковые вещества, поступающие с продуктами питания или кормом, под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма.

Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках продуктов питания в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей 60–120 г полноценного белка.

Высокой интенсивностью биосинтеза белков характеризуются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот.

Микроорганизмы в качестве источника кормового белка имеют ряд преимуществ по сравнению с растительными и животными организмами. Так, они отличаются высоким

(до 60 % сухой массы) и устойчивым содержанием белков, тогда как в растениях концентрация белковых веществ значительно изменяется в зависимости от условий выращивания, климатических и погодных условий, типа почвы, агротехники и др. Наряду с белками в микробных клетках накапливаются и другие ценные в питательном отношении БАВ: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных кислот, витамины, макро- и микроэлементы.

При использовании микроорганизмов на ограниченной площади можно организовать промышленное производство и получать большое количество продукта в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности, т.е. одновременно позволяют решать другую важную проблему – утилизации данных отходов в целях охраны окружающей среды. В качестве источников кормового белка наиболее часто используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли и т.д.

2. Получение кормовых белков

2.1. Получение кормовых дрожжей

Впервые дрожжи стали использовать в качестве источника белка для человека и животных в Германии во время первой мировой войны, когда была разработана промышленная технология культивирования пивных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), предназначенных для добавления в продукты питания. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей был пущен в 1935 г. Дрожжи выращивали на гидролизатах из отходов древесины и другого целлюлозосодержащего растительного сырья, образующих при гидролизе легкоусвояемые для микроорганизмов формы углеводов. В настоящее время биотехнологической промышленностью России на основе гидролизатов растительного сырья производится значительный объем кормовых дрожжей для сельского хозяйства.

В качестве исходного сырья при такой технологии получения белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

Измельченное растительное сырье, содержащее большое количество клетчатки, гемицеллюлоз, пентазонов, подвергают кислотному гидролизу при повышенном давлении и температуре. В результате 60–65 % содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов. Полученный гидролизат отделяют от лигнина, избыток кислоты, применяемой для гидролиза, нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов. Полученная таким путем питательная среда подается в ферментерный цех, в котором осуществляется выращивание дрожжей.

Типовая технологическая схема кислотного гидролиза растительного сырья включает следующие стадии: в гидролиз-аппарате осуществляется кислотный гидролиз растительного сырья, полученный гидролизат поступает на трехступенчатую испарительную установку, где производится его охлаждение, а после он поступает на конденсацию в теплообменник. Охлажденный гидролизат подвергается инверсии, которая происходит в инвенторе при 100 °С и атмосферном давлении. Данный процесс реализуется в течение 6–8 ч. Затем гидролизат поступает на нейтрализацию для освобождения от серной кислоты. Нейтрализация происходит непрерывно в двух или трех последовательно соединенных нейтрализаторах с применением известкового молока или аммиачной воды. После нейтрализат поступает на осветление, которое осуществляется в отстойниках (при этом температура снижается до 40–25 °С). Окончательное охлаждение

нейтрализата осуществляют в вакуум-охладительных установках и теплообменниках, в результате получают охлажденное нейтрализованное сусло.

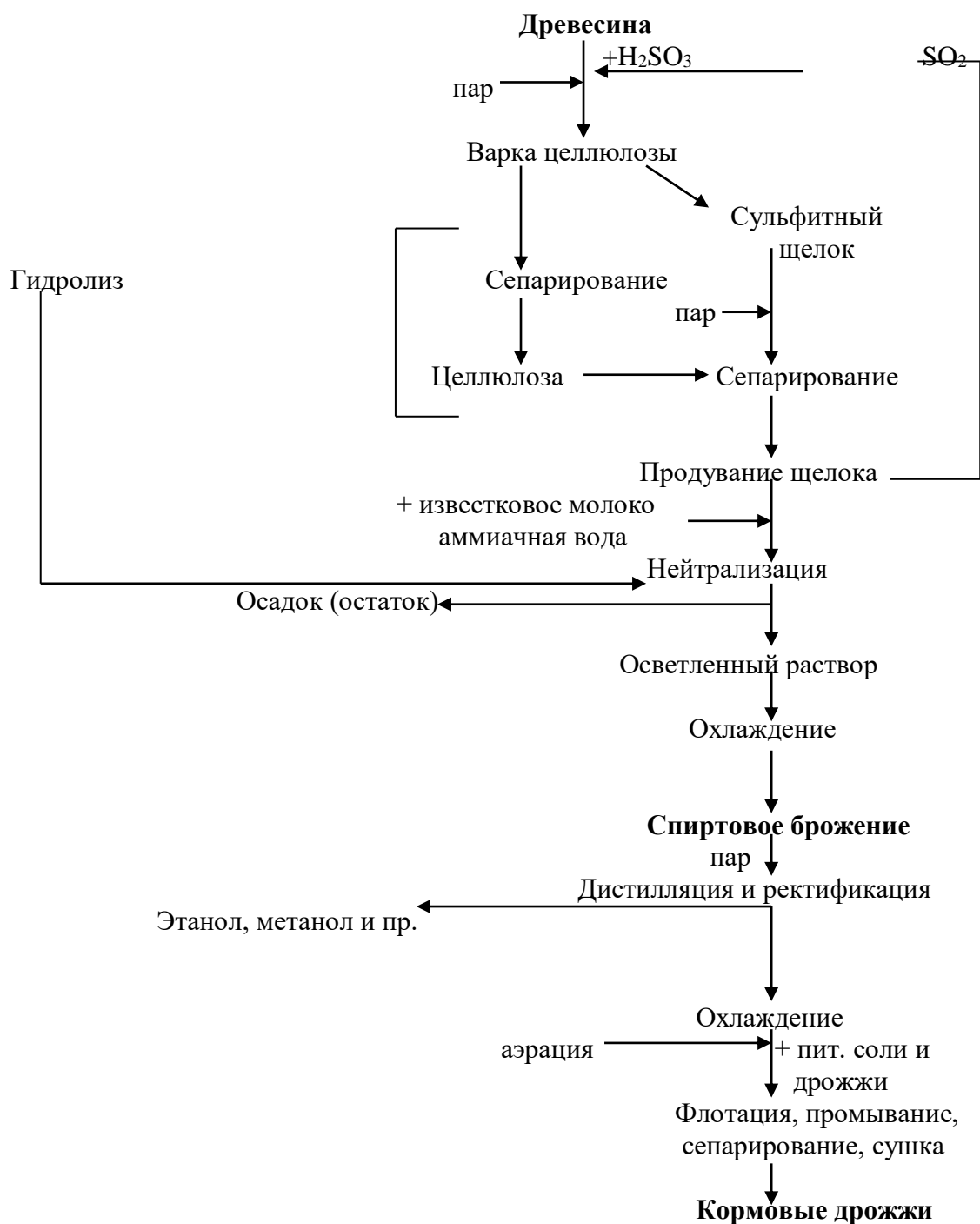


Рис. 1. Схема комбинированной переработки целлюлозы для получения этилового спирта и кормовых дрожжей

Таким образом, основными стадиями приготовления питательной среды с целью получения кормовых дрожжей являются: гидролиз, инверсия, нейтрализация, отстаивание и охлаждение. Иногда нейтрализованный гидролизат подвергают продувке воздухом для отделения летучих примесей.

Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, способные использовать в качестве

источника углерода гексозы, пентозы и органические кислоты. При оптимальных условиях из 1 т отходов хвойной древесины можно получить 200 кг кормовых дрожжей.

Процесс культивирования дрожжей осуществляется в нестерильных условиях. Для получения кормовых дрожжей применяется технология их глубинного культивирования, при которой обеспечивается режим постоянного перемешивания суспензии микробных клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации. Основные параметры культивирования дрожжей следующие: концентрация источников углерода – 7,0 %, температура – 33–35 °С, рН среды – 4,0–4,2, конечная концентрация биомассы – 43–54 г/л абсолютно сухого вещества. В целях поддержания заданного температурного режима в конструкции ферментера предусматривается система отвода избыточного тепла. Рабочий цикл выращивания культуры дрожжей длится около 20 ч. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с суспендированными в ней клетками дрожжей выводится из ферментера, а в него вновь подается питательный субстрат и культура дрожжевых клеток для выращивания.

Суспензия дрожжевых клеток, выведенная из ферментера, подается на флотационную установку, с помощью которой производится отделение биомассы дрожжей от культуральной жидкости. В процессе флотации происходит вспенивание суспензии, при этом дрожжевые клетки всплывают на поверхность вместе с пеной, которая отделяется от жидкой фазы декантацией. После отстаивания дрожжевая масса концентрируется с помощью сепаратора. Для достижения лучшей переваримости дрожжей в организме животных проводится их специальная обработка (механическая, ультразвуковая, термическая, ферментативная), обеспечивающая разрушение клеточных оболочек. Затем дрожжевая масса упаривается до необходимой концентрации и высушивается (влажность готового продукта не должна превышать 8–10 %).

В сухой дрожжевой массе содержится: 40–60 % сырого белка, 25–30 % усвояемых углеводов, 3–5 % сырого жира, 6–7 % клетчатки и зольных веществ, большое количество витаминов (до 50 мг%). Посредством обработки дрожжей УФ лучами проводится их обогащение витамином D₂, который образуется из содержащегося в них эргостерина. Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые дрожжи выпускают в гранулированном виде.

На основе ферментации гидролизатов растительного сырья наряду с производством кормовых дрожжей получают также этиловый спирт (рис. 1). В этом случае особенность технологии заключается в том, что вначале проводится спиртовое брожение, в результате которого происходит утилизация гексоз, содержащихся в гидролизате. После отгонки спирта остается неиспользованный субстрат – барда, содержащая в основном пентозы. Эту послеспиртовую барду используют как питательную среду для выращивания кормовых дрожжей. Таким образом, из гидролизатов растительных отходов одновременно могут быть получены два вида ценной продукции.

Технология получения кормовых дрожжей на основе спиртовой барды усовершенствована в ФГУП «Госниисинтезбелок». В основу разработанной биотехнологии переработки спиртовой барды положен способ непрерывной аэробной ферментации с добавлением в культуральную жидкость углеродсодержащего источника – зерносырья, что позволяет увеличить выход белковой биомассы и сделать производство рентабельным. В качестве продуцента белка используется устойчивая ассоциация подобранных микроорганизмов: *Saccharomycopsis fibuligera* и *Rhodococcus erythropolis*. Оптимизированный режим ферментации со скоростью потока 0,12 ч⁻¹ и уровнем аэрации среды 0,7 м³/м³* мин. обеспечивает получение готового продукта – кормовой белковой добавки, содержащей не менее 50–52 % протеина, с выходом от исходного сырья (в пересчете на сухие вещества) – 85–90 %. Экологически безопасная биотехнологическая установка для промышленной реализации данной технологии включает следующие стадии: ферментацию, концентрирование и сушку готового продукта. Она обеспечивает круглогодичную переработку до 100 тыс. т. в год спиртовой

барды, получение белковой кормовой добавки (порошок или гранулы), содержащей полный набор необходимых аминокислот, витамины группы В, микроэлементы, служащей для обогащения протеином рационов сельскохозяйственных животных и птиц, и рентабельность производства при удельных энергетических затратах на технологию 0,45–0,5 тыс. кВт-ч/т и сроке окупаемости установки 1,7–2 года.

В России и некоторых нефтеперерабатывающих странах разработаны технологии получения кормовых дрожжей из *n*-парафинов нефти. Дрожжевые клетки могут использовать для своего роста в качестве источников углерода неразветвленные углеводороды с числом углеродных атомов от 10 до 30, представляющие собой жидкие фракции с температурами кипения 200–320 °С, выделяемые из нефти путем перегонки. Очищенные фракции углеводородов нефти, используемые для выращивания дрожжей, могут быть получены 3 методами: низкотемпературной кристаллизации, карбамидной депарафинизации и адсорбции на молекулярных ситах. В соответствии с первым методом проводится кристаллизация высококипящих фракций после растворения их в смеси органических растворителей при постоянном охлаждении. Затем очищенные кристаллизацией продукты используют для приготовления питательной среды для культивирования микроорганизмов. Второй метод основан на способности *n*-парафинов нефти образовывать прочный комплекс с молекулами карбамида, который после отделения от остальных фракций при нагревании легко разлагается, в результате с помощью перегонки можно получить очищенную фракцию *n*-парафинов. Третьим методом производится адсорбция нужных фракций углеводородов нефти на молекулярных ситах (цеолитах), а после проводят их десорбцию, и таким путем удается выделить фракции высокой степени чистоты.

В других странах описываемая технология производства дрожжей не получила широкого развития из-за высоких мировых цен на нефть. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти был пущен в 1971 г.

В питательную среду, приготовленную на основе *n*-парафинов нефти, добавляют макро- и микроэлементы, необходимые витамины и аминокислоты, аммиачную воду (в качестве источника азота). В процессе культивирования дрожжей в ферментере поддерживается оптимальный температурный режим и режим аэрации. Наиболее эффективны для выращивания на *n*-парафинах нефти отселектированные штаммы дрожжей *Candida guilliermondii*. Выделение и сушка дрожжевой массы проводится примерно по такой же технологии, как и в гидролизном производстве. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК) для кормления сельскохозяйственных животных. БВК содержит до 50–60 % белковых веществ, а содержание остаточных углеводов допускается не более 0,1 %.

В целях более полного использования сырья и снижения в товарном продукте содержания остаточных углеводов разработаны усовершенствованные технологии получения БВК, включающие двухступенчатую ферментацию и последующую экстракцию из дрожжей остаточных углеводов бензином. При этом содержание сырого белка в дрожжевой массе может быть повышено до 58–65 % (в расчете на сухую массу), а содержание остаточных углеводов снижено до 0,05 %.

Хорошим субстратом для выращивания кормовых дрожжей является молочная сыворотка (производственный отход при переработке молока). В 1 т молочной сыворотки в среднем содержится 10 кг полноценного белка и 50 кг лактозы, который легко утилизируется микроорганизмами. Для выделения из нее белков разработана эффективная технология с применением метода ультрафильтрации низкомолекулярных веществ через мембраны. Получаемые таким способом белки используются для приготовления сухого обезжиренного молока или в качестве пищевой белковой добавки. Остающиеся после отделения белков жидкие отходы (пермеат), содержащие лактозу, могут быть переработаны в обогащенные белками кормовые продукты путем культивирования дрожжей. Часто дрожжеванию подвергается молочная сыворотка без предварительного

выделения из нее белков, при этом выращиваются специальные расы кормовых дрожжей из рода *Torulopsis*. На основе дрожжевания молочной сыворотки производится 3 вида кормовых белковых продуктов: заменитель цельного молока для кормления молодняка сельскохозяйственных животных («БИО-ЗЦМ»), жидкий белковый продукт («Промикс») с содержанием белков в 2,5–3 раза выше, чем в исходной молочной сыворотке и сухой обогащенный дрожжевыми белками продукт («Провилакт»), применяемый как заменитель сухого обезжиренного молока.

Кроме того, во ФГУП Госниисинтезбелок разработан биотехнологический способ получения белкового продукта при культивировании смешанной культуры микроорганизмов на молочной сыворотке. Проведенное исследование было направлено на разработку промышленной технологии переработки многотоннажных отходов молокозаводов и получение питательного белкового продукта. Известно, что непосредственное использование молочной сыворотки в пищевой и комбикормовой промышленности нецелесообразно из-за неблагоприятного сочетания в ней углеводов, белков и минеральных веществ. Повышение питательных свойств молочной сыворотки возможно путем увеличения содержания в ней белка и снижения содержания углеводов. Для решения данной задачи предложено использование симбиотического консорциума бактерий *Lactobacillus casei* и *Propionibacterium freudenreichii*. При аэробном выращивании биомассы используют питательную среду, состоящую из молочной сыворотки и фонового количества микроэлементов. В отдельных опытах выращивание проводят на предварительно сконцентрированной молочной сыворотке (до 16–22 % сухих веществ). В ходе проводившегося исследования изучены кривые роста консорциума бактерий при 2 способах засева культур (одновременный и последовательный засев), а также определен оптимальный режим подачи посевной культуры, построена математическая модель процесса, позволяющая по кинетическим и стехиометрическим коэффициентам рассчитать режим подачи кислорода и время накопления биомассы. Получаемая биомасса после ферментации подвергается автолизу и сушке. Готовый белковый продукт содержит 24–28 % протеина, в том числе аминокислоты (лизин – 5,5–6%), лейцин – 7–8 %, валин – 37–38 %, валин – 1,2–1,5 %, пролин – 5,2–5,5 % и др.), витамины групп В, РР, А и микроэлементы. Кроме того, исследованы режимы обработки биомассы для повышения содержания белка в продукте до 60–70 %. Проведено опытное испытание по применению полученного биопродукта в качестве белковой добавки при производстве колбасных и мучных изделий, а также в составе корма для кошек и собак. На основе разработанной биотехнологии планируется создание опытной установки производительностью 50 т/год готового продукта. Предложенная технология защищена патентом РФ.

Кроме углеводов и углеводовородов в качестве источников углерода дрожжевые клетки могут также использовать низшие спирты – метанол и этанол, которые обычно получают из природного газа или растительных отходов. Биомасса, полученная после культивирования дрожжей на спиртах, отличается высоким содержанием белков (56–62 % от сухой массы). При этом содержание в ней вредных примесей значительно ниже по сравнению с кормовыми дрожжами, выращенными на *n*-парафинах нефти.

Как показывают опыты по изучению питательных свойств кормовых дрожжей, они достаточно хорошо перевариваются в организме животных (перевариваемость белков составляет 80–90 %), по сумме незаменимых аминокислот близки к эталону ФАО, а по содержанию в белках лизина, треонина, валина и лейцина существенно превышают эталон ФАО (табл. 1). Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину и в них содержится мало других серосодержащих аминокислот.

**Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов
(г на 100 г белка)**

Аминокислота	Дрожжи	Бактерии	Водоросли	Грибы	Соевый шрот	Эталон ФАО
Лизин	6–8	6–7	5–10	3–7	6,4	4,2
Триптофан	1–1,5	1–1,4	0,3–2,1	1,4–2	1,4	1,4
Метионин	1–3	2–3	1,4–2,5	2–3	1,3	2,9
Треонин	4–6	4–5	3–6	3–6	4,0	2,8
Валин	5–7	4–6	5–7	5–7	5,3	4,2
Лейцин	6–9	5–11	6–10	6–9	7,7	4,8
Изолейцин	4–6	5–7	3,5–7	3–6	5,3	4,2
Фенилаланин	3–5	3–4	3–5	3–6	5,0	2,8

Кормовые дрожжи по сравнению с растительными источниками белков имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот (4–6 % от сухой массы), которые в такой концентрации оказывают вредное воздействие на организм животных. В результате их гидролиза образуется большое количество пуриновых оснований, превращающихся в соли мочевой кислоты, которые, откладываясь в организме, могут стать причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Вследствие этого оптимальная норма добавления дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5–10 % от сухого вещества или 10–20 % дрожжевого белка от общего количества белка в кормовом рационе.

Кормовые дрожжи, культивируемые на питательной среде из *n*-парафинов нефти, могут содержать многие вредные примеси (производные бензола, D-аминокислоты, аномальные липиды, различные токсины и канцерогенные вещества), поэтому их подвергают специальной очистке (экстракция бензином).

При организации производства кормовых дрожжей во избежание загрязнения окружающей среды возникают проблемы очистки газообразных и жидких отходов, в связи с чем ведется работа по созданию экологически чистых безотходных технологий с замкнутым циклом водопользования.

Кроме совершенствования производственной технологии, важное значение имеет создание высокопродуктивных штаммов дрожжей, способных накапливать большое количество белка, быстро наращивать биомассу и эффективно использовать субстрат для жизнедеятельности. С целью создания новых штаммов микроорганизмов применяют как традиционные методы селекции, так и генно-инженерные технологии.

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов сельскохозяйственных животных ставится задача сделать эти белки пригодными для питания человека. Уже в 1930–1940 гг. в некоторых странах были разработаны технологии культивирования пивных и других пищевых дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, *Candida utilis*), которые использовались как белковые добавки к разным пищевым продуктам.

2.2. Получение белковых концентратов из бактерий

Наряду с получением кормовых дрожжей, важное значение для кормопроизводства имеют также бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60–80 % от сухой массы. Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть использованы в качестве источников полноценного кормового белка. Бактерии способны наращивать биомассу в несколько раз быстрее дрожжевых клеток. Кроме того, в белке бактерий содержится значительно больше серусодержащих аминокислот, вследствие чего они имеют более высокую биологическую ценность по сравнению с белком дрожжей.

Источником углерода для бактерий могут служить различные газообразные продукты (природный и попутный газы, газовый конденсат и др.), низшие спирты (метанол, этанол), водород.

При использовании в качестве сырья газообразных продуктов, основным компонентом которых является метан, питательную смесь под давлением подают в специальный ферментер струйного типа. В целях лучшей утилизации сырья микроорганизмами в таком ферментере предусматривается рециркуляция газовой смеси. Для обеспечения необходимой аэрации культуры бактерий производится продувка ферментера воздухом или кислородом. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylococcus*, способные при оптимальных условиях утилизировать до 85–90 % метана, подаваемого в ферментер. Все технологические линии, связанные с культивированием бактерий в газовой среде, требуют точного контроля за составом среды и оснащения производственных установок, герметизированным, взрывобезопасным оборудованием.

После окончания ферментации клетки бактерий осаждают и отделяют от питательной среды на сепараторе. Затем полученную бактериальную массу подвергают механической или ультразвуковой обработке для разрушения клеточных оболочек, после чего высушивают и используют для приготовления кормовых белковых концентратов.

В связи с тем, что газовая среда из метана и воздуха взрывоопасна и для улучшения утилизации метана бактериями требует постоянной рециркуляции, производство кормового белка из газообразных продуктов является сложным и дорогостоящим. Более широкое применение находит технология выращивания бактериальной белковой массы на метаноле, который можно легко получить путем окисления метана. При культивировании на питательной среде, содержащей метанол, наиболее эффективны бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. Эти бактерии выращивают в обычном ферментере с использованием жидкой питательной среды.

Широкомасштабное производство кормовых белков на основе метанола впервые было организовано в Англии. Концерном «ICI» выпускается кормовой белковый препарат с коммерческим названием «Прутин». В нашей стране также разработана технология получения бактериальной белковой массы из метанола, выпускаемой под коммерческим названием «Меприн», содержащей в своем составе до 70–74 % от сухой массы белков, до 5 % липидов, около 10 % минеральных веществ, 10–13 % нуклеиновых кислот. На основе культивирования бактерий рода *Acinetobacter* разрабатывается технология получения кормового белка из этанола («Эприн»), который может иметь и пищевое назначение.

Высокой интенсивностью синтеза белков характеризуются водородоокисляющие бактерии, способные накапливать в своих клетках до 80 % сырого белка в расчете на сухое вещество. Эти бактерии используют энергию окисления водорода для утилизации углекислоты, а некоторые штаммы и для усвоения атмосферного азота. Для культивирования водородоокисляющих бактерий в составе газовой среды обычно содержится 70–80 % водорода, 20–30 % кислорода и 3–5 % углекислоты. Высокую эффективность при выращивании на такой газовой среде имеют бактерии родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corinebacterium* и др.

Обычно водород для производства белковой массы получают из воды путем ее электролитического или фотохимического разложения. Углекислота может быть использована из газообразных отходов каких-либо промышленных производств или из топочных газов, что одновременно решает проблему очистки газовой среды. Производство кормового препарата на основе водородоокисляющих бактерий может быть также организовано вблизи химических предприятий, где в качестве побочного продукта образуется водород.

Обычно кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5–7,5 % от белка рациона. Основное препятствие, которое не позволяет его использовать в большей концентрации, – повышенное содержание нуклеиновых кислот

(10–25 %). Кроме того, в бактериальной массе наряду с полезными компонентами в значительном количестве синтезируются трудно усвояемые формы липидов. Кроме того, методы выделения и очистки бактериальных белковых препаратов являются сложными и дорогостоящими.

2.3. Получение белков на основе природного газа

Сырьем для получения белковых веществ может служить природный газ (СН₄). В данном случае в качестве продуцентов используют бактерии рода *Pseudobacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Metanomonas*. Пути усвоения природного газа микроорганизмами различны. Так, выделяют 2 пути ассимиляции природного газа бактериями:

- 1) гетеротрофный путь: окисление природного газа через спирт и альдегид;
- 2) автотрофный путь сводится к образованию углекислого газа и активного водорода.

Выращивание бактерий на метане отличается рядом особенностей: медленный рост микроорганизмов, низкая растворимость метана (0,02 г в 1 л культуральной жидкости), повышенная потребность клеток в кислороде. По сравнению с выращиванием бактерий на мелассе необходимо в 5 раз, на парафинах – в 2–3 раза больше кислорода. В технологии производства кормового белка на метане важно создать эффективное перемешивание.

При культивировании микроорганизмов рода *Metanomonas* в ферментере используют газовую среду, содержащую (%): кислород (8–11), метан (10–15), углекислый газ (5,0) и азот (69–77). Причем выращивание осуществляют при повышенном давлении (при этом в начале ферментации давление составляет 4 МПа, а в конце – 0,1 МПа). Температура культивирования составляет 30 °С. Выращивание осуществляют в течение 2 суток. В данном случае реализуется метод периодического культивирования, а конечная концентрация биомассы составляет 1 г в 1 л.

2.4. Получение кормовых белков из водорослей

В России и ряде других стран для производства кормового белка используются одноклеточные водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, а также сине-зеленые водоросли рода *Spirulina*, способные синтезировать белки и другие органические вещества из углекислоты, воды и минеральных веществ за счет усвоения энергии солнечного света. Для их выращивания необходимо обеспечивать определенные режимы освещения и температуры, а также требуются большие объемы воды. Чаще всего в естественных условиях водоросли выращивают в южных регионах с использованием бассейнов открытого типа, однако разрабатываются технологии их культивирования в закрытой системе.

Водоросли хлорелла и сценедесмус требует для своего выращивания нейтральной среды, их клетки имеют довольно плотную целлюлозную оболочку, вследствие чего хуже перевариваются в организме животных. Для лучшей их перевариваемости проводится разрушение целлюлозных оболочек посредством специальной обработки.

Клетки спирулины в 100 раз крупнее хлореллы, однако, они не имеют прочной целлюлозной оболочки, поэтому лучше перевариваются в организме животных. Выращивается спирулина в щелочной среде (рН 10–11), при естественных условиях в щелочных озерах.

По интенсивности накопления биомассы водоросли, хотя и уступают кормовым дрожжам и бактериям, значительно превосходят сельскохозяйственные растения. При их выращивании в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности можно получать до 70 т сухой биомассы в год, тогда как при возделывании пшеницы – 3–4 т, риса – 5 т, сои – 6 т, кукурузы – 7 т.

Содержание белков в клетках хлореллы и сценедесмус составляет 45–55 % в расчете на сухую массу, а в клетках спирулины достигает 60–65 %. Белки водорослей хорошо

сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот, в них недостаточно лишь содержание метионина. Наряду с высоким содержанием белковых веществ, в клетках водорослей довольно много синтезируется полиненасыщенных жирных кислот и провитамина А (до 150 мг%). Каротина в биомассе водорослей в 7–9 раз больше, чем в травяной муке из люцерны, отличающейся наиболее высоким содержанием этого провитамина среди кормовых трав. Содержание нуклеиновых кислот в одноклеточных водорослях значительно ниже (4–6 %), чем у бактерий, однако несколько выше по сравнению с растительными источниками белка (1–2 %).

Технология получения белковой массы из клеток водорослей включает выращивание промышленной культуры в культиваторах открытого или закрытого типа, отделение водорослей от массы воды, приготовление товарного продукта в виде суспензии, сухого порошка или пастообразной массы. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды является энергоемким, т.к. необходимо перерабатывать большие объемы жидкости.

Вначале отстаивают клеточную суспензию, затем клетки водорослей отделяют от воды путем декантации. Для ускорения осаждения клеток часто применяют химическую флокуляцию, вызывающую быструю коагуляцию частиц. После осаждения клеточной биомассы ее пропускают через сепаратор, в результате происходит концентрирование суспензии до необходимой концентрации. Если требуется получить пастообразный препарат, то полученную белковую массу высушивают. Для улучшения переваримости биомассы клеток хлореллы и сценедесмуса проводится их обработка с целью разрушения клеточных оболочек.

В нашей стране наиболее распространено выращивание хлореллы, которая применяется для кормления сельскохозяйственных животных в виде суспензии (1,5 г/л сухого вещества) или сухого порошка. Суточная норма суспензии хлореллы при кормлении молодняка крупного рогатого скота – 3–6 л, взрослых животных – 8–10 л. При добавлении в корм жвачных животных муки хлореллы допускается замена 50 % растительного белка белком водорослей.

Важное значение имеет выращивание водорослей на стоках промышленных предприятий, тепловых электростанций, животноводческих комплексов, т.к. в этих случаях наряду с получением кормового белка одновременно решаются проблемы, связанные с защитой окружающей среды. Так, выращивание культуры сценедесмус или хлореллы на стоках животноводческих комплексов в течение 15 сут. позволяет почти полностью очистить их от органических веществ, исчезают неприятные запах и цвет. При культивировании водорослей на промышленных стоках или стоках тепловых станций используется отводимый с этих объектов избыток тепла, а также утилизируется углекислота, образуемая как побочный продукт технологических процессов в результате сжигания различных отходов.

Культиваторы открытого типа для выращивания водорослей имеются во многих странах. Крупнейшая фирма по выращиванию хлореллы «Хлорелла Сан Компани» находится в Японии. В Болгарии на водах термальных источников культивируются водоросли хлорелла и сценедесмус, причем болгарским ученым удалось получить штаммы хлореллы без целлюлозной оболочки, вследствие чего биомасса таких клеток хорошо переваривается в организме животных. В значительном количестве белковые концентраты из водоросли спируллины производятся в странах центральной Африки и в Мексике, в которых имеются щелочные озера. Крупнейшим производителем различной продукции из биомассы и белков спируллины является фирма «Соса Текскоко» (Мексика). В Италии разрабатывается технология выращивания клеток спируллины на морской воде и в культиваторах закрытого типа.

В связи с тем, что биомасса водорослей рода *Spirulina* легко переваривается ферментами желудочного сока и характеризуется высоким содержанием белков (до 70 % сухой массы), хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, она в ряде стран

используется для приготовления продуктов питания, главным образом кондитерских изделий, обогащенных белком.

Учитывая важное значение водорослей, вводимых в промышленную культуру, в качестве дополнительного источника полноценного белка для кормления сельскохозяйственных животных и питания людей, учеными разной специализации – селекционерами, генетиками, биохимиками – проводятся исследования по улучшению существующих промышленных штаммов одноклеточных водорослей и получению новых генотипов, которые должны сочетать в себе высокую интенсивность фотосинтеза, морозоустойчивость, хорошую перевариваемость, способность синтезировать большое количество белка лучшего качества (повышенное содержание незаменимых аминокислот) и полнее утилизировать субстрат. Важная роль в реализации таких исследований отводится методам генетической инженерии.

2.5. Получение белков из микроскопических грибов

Ценным источником белков, хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, являются клетки мицелия многих микроскопических грибов. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, вследствие чего могут использоваться не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавка в пищу человека. Сырьем для промышленного выращивания микроскопических грибов обычно служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы и лигнин. При этом одновременно решаются 2 важные задачи – получение белковой массы и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей среды.

Важно найти активные штаммы микроорганизмов, способные утилизировать углерод лигнина, обладающего высокой устойчивостью к разложению микрофлорой. В природе лигнин разлагается лишь грибами коричневой и белой гнили из родов *Stropharia*, *Pleurotus*, *Abortiporus*, *Coriolus*, *Stereum* и др. В настоящее время в процессе исследований отобраны атоксичные быстрорастущие штаммы мезо- и термофильных грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* для промышленного культивирования. Клетки мицелия этих грибов имеют тонкую клеточную оболочку, вследствие чего очень хорошо перевариваются в желудочно-кишечном тракте животных. Они содержат в своем составе комплекс ароматических веществ, улучшающих их вкусовые качества, богаты витаминами и легкоусвояемыми липидами. По сравнению с дрожжевыми, белки микроскопических грибов отличаются повышенным содержанием серусодержащих аминокислот и лучшей усвояемостью. Концентрация нуклеиновых кислот в грибном мицелии (1–4 % от сухой массы) почти такая же, как в тканях растительного организма, вместе с тем в биомассе грибов меньше, чем в дрожжах, синтезируется белков (20–60 % от сухой массы) и у них относительно медленней происходит рост биомассы (удвоение биомассы через 4–16 ч, тогда как у дрожжей через 2–3 ч).

Низшие мицелиальные грибы, культивируемые на целлюлозо- и лигнинсодержащих растительных отходах, вследствие их способности синтезировать комплекс гидролитических ферментов разлагают целлюлозу и лигнин до простых веществ, из которых образуются аминокислоты и белки. В целях ускорения роста грибов проводится предварительная обработка сырья, повышающая доступность его компонентов для утилизации микроорганизмами. Чаще всего применяют кислотно-щелочный способ обработки целлюлозо- и лигнинсодержащих отходов, отпаривание под давлением, обработка аммиаком и каустической содой. После такой обработки происходит полное или частичное разложение трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина, что обеспечивает ускоренный рост грибной массы и сокращение сроков промышленного культивирования грибов (до 7–8 сут.).

В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания.

Для культивирования грибов на твердой питательной среде разработан метод твердофазной ферментации, включающий: измельчение и обработку растительного сырья парами воды и аммиака, обогащение сырья минеральными веществами, посев и выращивание мицелия грибов в заданном режиме аэрации и поддержания оптимальной температуры. Однако при такой технологии культивирования грибов коэффициент использования сырья невысоок, что предопределяет и сравнительно невысокий уровень содержания белка в выращиваемой грибной массе (20–30 % от сухой массы). Так, прямое культивирование низших мицелиальных грибов на соломе и других отходах растениеводства обеспечивает включение углерода из этих источников в органическое вещество грибного мицелия на 17–25 %. Более высокий коэффициент использования сырья обычно достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности. С этой целью применяют метод глубинного культивирования, как при выращивании кормовых дрожжей. Содержание белков в грибной массе, выращенной на жидкой питательной среде, может достигать 50–60 % от сухой массы. В целях более полного использования также практикуется совместное культивирование грибов и бактерий. Наряду с использованием растительных отходов, разработаны технологии по переработке в грибной белок торфа, навоза и экскриментов животных.

Хорошая перевариваемость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания в ней нуклеиновых кислот позволяют ее использовать в качестве кормовой добавки в значительно большей концентрации, чем кормовые дрожжи. Обычно при кормлении молодняка животных допускается введение в кормовые рационы грибного белка в пределах 15–20 % от белка корма, а при кормлении взрослых животных возможна замена в корме 50 % растительного белка на грибной.

3. Особенности получения пищевого белка

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов сельскохозяйственных животных, разработана технология получения из дрожжей пищевых белков. Потребность населения нашей планеты в продуктах питания полностью не удовлетворяется. Особенно остро ощущается недостаток пищевого белка, дефицит которого оценивается в 10–25 млн. т. в год, поэтому уже в 1930–1940 гг. в некоторых странах разработаны технологии культивирования пивных и других пищевых дрожжей (*Saccharomyces*, *Candida*), которые использовались как белковые добавки к различным пищевым продуктам.

Наряду с интенсификацией традиционных методов, увеличению ресурсов пищевого белка могут способствовать новые промышленные способы производства продуктов питания. В последние годы во всем мире расширяется новое направление в пищевой биотехнологии – обогащение хорошо известных пищевых продуктов белком растительного, животного и микробного происхождения.

Дрожжи содержат 40–55 % белка и усваиваются организмом человека на 85–88 %, занимая по этому показателю промежуточное положение между белками растительного и животного происхождения. Белок дрожжей обычно беден метионином и цистеином, и богат лизином и треонином. Отсюда очевидна целесообразность его переработки вместе с белками зерновых культур.

Путем выращивания хлебопекарных дрожжей на меласно-солевой среде оптимизированного состава в присутствии стимулятора роста (гипоксена) увеличен выход их биомассы на 10–15 %, а также повышено содержание «сырого» протеина на 52–54 %.

Разработана технология получения белково-углеводного концентрата с содержанием липидов – 2,0–3,0 % и нуклеиновых кислот – 2,0–2,5 % из биомассы дрожжей путем частичной деградациии клеточной стенки ферментативными препаратами гидролитического действия, обезжиривания раствором этанола и денуклеинизации собственными ферментами клетки. Удовлетворительные функциональные свойства

полученного концентрата и его высокая биологическая ценность позволили наработать опытную партию хлебобулочных изделий профилактического назначения.

Основные принципы получения пищевого белка те же, что и получения кормового белка. Однако при получении пищевого белка ограничивается круг используемых субстратов и предъявляются более жесткие требования к составу биомассы и конечного продукта. Так, в пищевой биомассе должно содержаться не менее 80 % белка, 2 % нуклеиновых кислот и 1 % липидов. На одного человека в сутки должно приходиться 10–20 г сухой биомассы.

Продуцентами пищевого белка являются: микроскопические грибы рода *Fusarium*, цианобактерии рода *Spirulina*, зеленые водоросли рода *Chlorella*. Для получения пищевых белков характерно использование в качестве субстрата этанола.

При переработке в пищевой белок биомассу дрожжей тщательно очищают. С этой целью клеточные оболочки дрожжевых клеток разрушают с помощью механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки. Затем гомогенную дрожжевую массу экстрагируют органическим растворителем. Продукт после такой очистки от органических и минеральных примесей обрабатывают щелочным раствором для растворения белков. После белковый раствор отделяют от оставшейся биомассы дрожжей и направляют на диализ. В процессе диализа из белкового раствора удаляют низкомолекулярные примеси. Белки, очищенные путем диализа, осаждают, высушивают. При этом полученную белковую массу используют в качестве добавок в различные пищевые продукты (сосиски, студни, паштеты, мясные и кондитерские начинки). Белки дрожжей также применяют при получении искусственного мяса. С этой целью проводят текстурирование белков, т.е. нагревание с последующим быстрым охлаждением и продавливание белковой пасты через отверстия малого диаметра. Для улучшения свойств в белковую пасту добавляют полисахариды и другие компоненты. Гидролизаты белков используют в качестве вкусовых приправ, для приготовления лекарственных препаратов и в лечебном питании.

4. Рекомбинантные белки

Высокая стоимость лекарственных препаратов, получаемых традиционным способом из дефицитного природного сырья, послужила предпосылкой для разработки технологии, основанной на применении генетически измененных микроорганизмов. Благодаря созданию биотехнологии растений и микроорганизмов, а также разрабатываемых методов изменения их генетического материала можно надеяться на дальнейшее ускорение в ближайшем будущем научно-технического прогресса в данной области. Разработка методов изменения генетического аппарата клеток, позволяющих вводить в них чужеродные гены, клонировать их, экспрессировать и получать нужные продукты, совершила настоящую революцию в биологии. Эти достижения находят самое широкое применение в медицине. Белки и пептиды, доступные совсем недавно лишь в очень небольшом количестве, сегодня предполагается производить в массовом масштабе и использовать для лечения различных заболеваний.

Рекомбинантная ДНК-биотехнология. Практическое использование рекомбинантных ДНК (рДНК) различного происхождения составляет основу рекомбинантной ДНК-биотехнологии (рДНК-биотехнология).

Генетическая рекомбинация заключается в обмене генами между двумя хромосомами. По определению, данному Понтекорво (1958 г.), рекомбинация – любой процесс, способный привести к возникновению клеток или организмов с двумя или более наследственными детерминантами, по которым их родители различаются между собой и которые соединены новым способом.

Живые организмы, чаще всего клетки прокариот, обладают рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами), которые узнают чужеродную ДНК, проникшую в организм, и расщепляют ее, таким образом, сводя на нет генетическую рекомбинацию

между эволюционно удаленными геномами. Обмен генами, представляющий собой сегменты ДНК, равно как и введение в клетку гена, принадлежащего другому виду, можно осуществить посредством рДНК-биотехнологии *in vitro*. Этот подход разработан на бактериях, в частности на *E.coli*, в клетки которых вводили гены животных и человека, и добились их репликации (самовоспроизведение нуклеиновых кислот, обеспечивающее точное воспроизведение генетической информации).

рДНК-биотехнология включает следующие этапы:

- ✓ получение чужеродной ДНК;
- ✓ разрезание полученной ДНК на фрагменты и их очистка;
- ✓ включение фрагмента чужеродной ДНК в векторную плазмиду и получение рДНК.
- ✓ введение рДНК в пермиссивные клетки и клонирование генов.
- ✓ амплификация (образование дополнительных копий хромосомных последовательностей) и экспрессия ДНК (функциональная активность генов).

Чужеродную ДНК можно получить с помощью химического или ферментативного синтеза, из любого организма или вирусов, с последующим определением ее первичной структуры. Если ДНК выделяют из клеток эукариот, то для клонирования, амплификации и экспрессии интроны (последовательности внутри структурного гена, не участвующие в кодировании белкового продукта гена; после транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам удаляются из мРНК (матричная РНК, служащая матрицей при синтезе белков на рибосомах) в процессе сплайсинга) не нужны. В таких случаях используют мРНК, образующуюся в процессе сплайсинга (ферментативное удаление интронов и соединение экзонов при синтезе мРНК; экзоны – участки структурного гена, кодирующие аминокислотную последовательность белкового продукта; они разделены интронами и объединяются в мРНК в непрерывную последовательность при сплайсинге).

Выделение генов из ДНК с помощью рестриктаз. Расщепление может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, в этом случае обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют двухнитевые (тупые) концы. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со смещением (сдвигом), так, что образуется «ступенька», т.е. одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов, образуя однонитевые (липкие) концы. В случае необходимости тупые концы могут быть превращены в липкие, для чего к ним присоединяют двухцепочечные последовательности (линкеры) с участками узнавания рестриктазы, способствующей образованию липких концов. Данный метод выделения генов из ДНК с помощью рестриктаз имеет существенные недостатки: трудно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, который соответствует нужному гену. Наряду с интересующим геном, фрагменты ДНК, как правило, включают лишние нуклеотидные последовательности, создающие трудности для использования гена. Рестриктаза может отщепить часть нуклеотидной последовательности гена, в результате чего он теряет функциональную полноценность.

Химико-ферментативный синтез генов является важной альтернативой «вырезанию» генов из нативной ДНК с помощью рестриктаз. Данный метод включает химический синтез коротких (8–16-тизвенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов. Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов и избежать проблем, связанных с элиминированием лишних нуклеотидных последовательностей в фрагментах ДНК, в том числе интронов. Кроме того, появляется возможность введения в гены участков узнавания различных рестриктаз, регуляторных последовательностей и т.п. Для данного метода необходима полная информация о нуклеотидной последовательности

синтезируемого гена, поэтому его применимость ограничена возможностями получения такой информации. Последовательность нуклеотидов в гене может быть воссоздана на основе первичной структуры соответствующего белка. Триумфом в анализе структуры гена является параллельное воссоздание нуклеотидной последовательности ДНК и цепочки аминокислотных остатков в кодируемом белке. С помощью химико-ферментативного метода получены гены соматостатина, А- и В-цепей инсулина, проинсулина.

Ферментативный синтез генов на основе мРНК, выделенной из клетки, является наиболее популярным и эффективным методом. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК, называемую комплементарной ДНК (кДНК), используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы. Преимущество данного метода состоит в том, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Кроме того, в данном случае легче создать условия, при которых клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК. На этом методе основано получение в 1979 г. гормона роста человека (соматотропина).

Фрагменты ДНК, полученные тем или иным способом, разделяют с помощью электрофореза на геле (агарозном, полиакриламидном и т.п.), из которого их экстрагируют, вырезая соответствующие участки геля. Эти участки, например, агарозного геля, расплавляют в пробирках при 68 °С, а ДНК экстрагируют фенолом, концентрируют изобутанолом, переосаждают этанолом и проводят анализ выделенных и очищенных фрагментов.

Следующим этапом является включение фрагмента чужеродной ДНК в вектор. Понятие «вектор» в молекулярную биологию введено в 1974 г. М. Томасом и обозначает «способный переносить в клетку-реципиент чужеродную ДНК любого происхождения». Вектор – молекулы ДНК, обеспечивающие амплификацию фрагмента в растущей популяции соответствующего вида. Для клонирования ДНК, например, в клетках *E. coli*, можно использовать векторы 2 классов – плазмиды и фаги (фаги – вирусы; вирусы, поражающие бактерии – бактериофаги; вирусы, поражающие актиномицеты – актинофаги). Преимущество плазмид перед фагами заключается в отсутствии лизиса клетки, возможного при работе с умеренными фагами. В 1978 г. Дж. Коллинс и Б. Хон впервые ввели в практику космидный вектор (*cos*-вектор), т.е. комбинированную векторную систему «плазида – ДНК фага λ », которой присущи свойства и фагов, и плазмид, обладающую большей емкостью (до 40 кб) по сравнению с ДНК фага λ . В таких комбинированных векторных системах *cos*-фрагмент генома фага λ участвует в упаковке ДНК в фаговую частицу на конечной стадии развития. Для упаковки ДНК необходимо, чтобы она содержала *cos*-участок и ее размер был примерно равным размеру генома фага λ . Достигнутые методы упаковки ДНК в фаговую головку при помощи космид позволяют получать библиотеки генов практически любых организмов.

Итак, схему конструирования рДНК в опытах *in vitro* можно представить следующим образом: кольцевая молекула вектора размыкается рестриктазой. При этом необходимо, чтобы полученная линейная молекула ДНК содержала липкие концы, комплементарные концам вводимой ДНК. Комплементарные липкие концы вектора и вводимого гена сшиваются, полученную рДНК, с помощью той же ДНК-лигазы вновь замыкают с образованием единой кольцевой молекулы.

Важной проблемой, возникающей при использовании вирусов в качестве генетических векторов, является аттенюация (ослабление патогенности для хозяина). Большое значение для биотехнологии имеет способность вирусов быстро транспортироваться из клетки в клетку, распространяясь по растительной или животной ткани так, что в короткие сроки развивается генерализованная инфекция по всему организму. Такое свойство вирусов открывает возможность генетической модификации

соматических клеток взрослого организма. В этом отношении открываются перспективы терапии наследственных заболеваний человека путем введения вирусов, разносящих недостающие гены по всем 10^{11} клеткам человеческого тела.

Плазмиды – автономные самореплицирующиеся генетические единицы, обнаруженные у бактерий, грибов, растений и животных. Наибольшее применение в генетической инженерии нашли бактериальные плазмиды, особенно плазмиды *E. coli* (*pBR322*, *pBR325*, *pACYC117*, *pACYC184*), а также сконструированные на основе плазмиды *ColE1*. Бактериальные плазмиды подразделяются на конъюгативные, способные к переносу генетической информации от клетки к клетке путем конъюгации бактерий, и неконъюгативные, передающиеся от одной клетки к другой путем бактериальной трансформации. Перенос неконъюгативных плазмид возможен только в том случае, если имеется плазида-помощник, способная к самостоятельному транспорту. Некоторые плазмиды способны к амплификации, т.е. образуют в клетке большое число копий, что резко повышает уровень фенотипического выражения генов.

При конструировании векторов исследователь вводит в него участки узнавания рестриктаз, а также гены-маркеры, кодирующие легко распознаваемые признаки, по которым можно отобрать клетки, являющиеся носителем вектора.

Перенос генов клетки организма-реципиента. Перенос рДНК осуществляется путем трансформации или конъюгации.

Трансформация – процесс изменения генетических свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые она обнаружена у пневмококков Ф. Гриффитом, показавшим, что некоторые клетки неvirulentных штаммов бактерий при заражении ими мышей совместно с virulentными штаммами приобретают патогенные свойства. В дальнейшем трансформация была продемонстрирована и изучена у разных видов бактерий. Установлено, что к ней способны лишь некоторые, так называемые «компетентные» клетки (способные включать чужеродную ДНК и синтезирующие особый трансформирующий белок). Компетентность клетки определяется и факторами внешней среды. Этому может способствовать обработка клеток полиэтиленгликолем или кальция хлоридом. После проникновения в клетку одна из нитей рДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком реципиентной ДНК может включиться в хромосому или внехромосомную единицу. Трансформация является наиболее универсальным способом передачи генетической информации и имеет наибольшее значение для генетических технологий.

Конъюгация – один из способов обмена генетического материала, при котором происходит однонаправленный перенос генетической информации от донора к реципиенту. Такой перенос находится под контролем особых конъюгативных плазмид (фактор фертильности). Перенос информации от донорской клетки в реципиентную осуществляется через специальные половые ворсинки (пили). Возможна передача информации и с помощью неконъюгативных плазмид при участии плазмид-помощниц.

Передача всего набора генов вируса или фага, приводящая к развитию в клетке фаговых частиц, называется трансфекцией. Ее методика, применительно к бактериальным клеткам, включает получение сферопластов, очистку инкубационной среды от нуклеаз и добавление очищенной фаговой ДНК (присутствие протаминсульфата повышает эффективность трансфекции). Данная методика применима к животным и растительным клеткам с участием челночных вирусных векторов.

Для клонирования ДНК используют пермиссивные клетки, к которым предъявляются следующие требования:

- ✓ не разрушаются чужеродные ДНК или РНК собственными ферментами;
- ✓ срабатывает механизм репликации вектора;
- ✓ проявляется выраженная активность промотора (специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции полимеразой) и/или терминатора (терминация – окончание синтеза ДНК, происходящее благодаря

выключению реакции с помощью специфического «стоп-сигнала» от специального терминатора в матричной цепи) транскрипции рДНК (матричный синтез РНК или ДНК, осуществляемый РНК-полимеразами);

- ✓ отмечается полный сплайсинг мРНК;
- ✓ наблюдается активная трансляция мРНК (перевод закодированной в мРНК информации в полипептидную цепь);
- ✓ отсутствует выраженная активность пептидогидролаз, катализирующих реакции гидролиза экспрессируемых чужеродных белков.

Скрининг и отбор рекомбинантных клеток: после переноса сконструированных ДНК, как правило, лишь небольшая часть реципиентных клеток приобретает необходимый ген, поэтому важным этапом является идентификация клеток, несущих ген-мишень. На первой стадии идентифицируют и отбирают клетки, несущие вектор, на основе которого осуществлен перенос ДНК. Отбор проводят по генетическим маркерам, которыми помечен вектор. Маркерами, как правило, являются гены устойчивости к антибиотикам. В этой связи отбор проводят высевом клеток на среды, содержащие конкретный антибиотик. После посева на этих средах вырастают только клетки, в составе которых находится вектор с генами устойчивости к антибиотикам. На второй стадии отбирают клетки, несущие вектор в ген-мишень. Для этого используют 2 группы методов: основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов или на идентификации признака, кодируемого геном-мишенью. При использовании первой группы методов из клеток, предположительно содержащих нужный ген, выделяют векторную ДНК, и в ней проводится поиск участков, несущих данный ген. Далее проводят секвенирование части нуклеотидной последовательности гена. Возможен и другой метод – гибридизация ДНК, выделенной из клеток, с зондом (искомый ген или соответствующая ему мРНК). При этом выделенную ДНК переводят в одноцепочечное состояние и вводят во взаимодействие с зондом. Далее определяют наличие двуцепочечных гибридных молекул ДНК. Во втором варианте возможен непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок – продукт транскрипции и трансляции гена-мишени. Кроме того, применяются селективные среды, поддерживающие рост клеток, приобретших ген-мишень.

С помощью методов генетической инженерии возможно конструирование новых форм микроорганизмов по заданному плану, способных синтезировать разнообразные продукты, в том числе эукариотических организмов. Рекомбинантные микробные клетки быстро размножаются в контролируемых условиях и способны утилизировать разнообразные, в том числе, недорогие субстраты.

Основные проблемы, возникающие при генетических манипуляциях, заключаются в следующем:

1. гены при трансформации, попадая в чужеродную среду, подвергаются воздействию протеаз, поэтому их надо защищать;
2. продукт трансплантированного гена, как правило, аккумулируется в клетках и не выделяется в среду;
3. большинство желаемых признаков кодируется не одним, а группой генов, что существенно затрудняет перенос и требует разработки технологии последовательной трансплантации каждого гена.

К настоящему времени генетическая инженерия освоила все царства живого. Фенотипическое выражение «чужих» генов (экспрессия) получено у бактерий, дрожжей, грибов, растений и животных. Блестящие успехи достигнуты на клетках наиболее и всесторонне изученных микроорганизмов. Эра рДНК применительно к растениям и высшим животным только начинается. В области генетической инженерии животных клонированы гены β -глобина мышей, фага λ . Помимо почечных клеток зеленой

африканской мартышки, испытываются все новые виды культуры животных клеток, в том числе клеток человека. Так, в клетках непарного шелкопряда с применением вирусного вектора удалось добиться экспрессии гена β -интерферона человека. Этот ген также клонирован в клетках млекопитающих. В генетической инженерии человека, как в генетическом конструировании растений, пока не достигнуто тканеспецифическое выражение генов. Решения данной проблемы ищут на путях введения определенных промоторов регуляторных участков в конструируемые векторы. Пока остается достаточно отдаленной задачей возможность улучшения сельскохозяйственных пород животных. К настоящему времени практически отсутствуют сведения по генетике таких признаков, как плодовитость, выход и жирность молока, повышение устойчивости к болезням и др., что препятствует попыткам генетических манипуляций в данной области.

Генетическая инженерия дает в руки биотехнолога не только новые продуценты ценных соединений, но улучшает и повышает эффективность ценных свойств традиционно используемых организмов. Распространенным методом повышения выхода полезного продукта является амплификация, т.е. увеличение числа копий генов. Образование многих целевых продуктов (аминокислот, витаминов, антибиотиков и др.) характеризуется длинным биохимическим путем синтеза, который управляется не одним, а десятками генов. Выделение таких генов и клонирование с помощью амплификации представляет довольно трудную, но в ряде случаев вполне решаемую задачу. Повышение выхода полезного продукта достигается также с помощью локализованного (сайт-специфического) мутагенеза *in vitro*, при котором химическими мутагенами обрабатывается не весь геном клетки, а лишь его фрагмент, полученный с помощью рестрикции.

4.1. Рекомбинантные продуценты

Развитие технологии рДНК позволяет проводить выделение генов эукариот и экспрессировать их в гетерологических системах. В настоящее время методы генетической инженерии позволяют конструировать генетические системы, способные функционировать в клетках прокариот и эукариот. Эти возможности позволяют создавать организмы, обладающие новыми ценными свойствами, например, бактериальные штаммы, способные синтезировать эукариотические белки.

Среди белковых продуктов, представляющих большой интерес, выделяются такие ценные БАВ, как гормоны. Важное место среди них занимают белковые и пептидные гормоны. Их до недавнего времени получали экстракцией из тканей животных при условии, что они не обладали выраженной видовой специфичностью. Сравнительно короткие пептидные гормоны пытались получать путем химического синтеза. Однако такой способ оказался экономически нерентабельным.

Успехи генетической инженерии вселили надежды на возможность клонирования генов синтеза ряда гормонов в микробных клетках, которые в значительной мере оправдались, в первую очередь, на примере микробиологического синтеза пептидных гормонов.

Первые успешные результаты по экспрессии химически синтезированной последовательности нуклеотидов ДНК, кодирующей 14-звенный пептидный гормон соматостатин (антагонист соматотропина), получены в 1977 г. в США компанией «Генетек». С целью предотвращения разрушения гормона в бактериальных клетках под воздействием пептидазы авторы применили подход, который впоследствии был успешно использован для получения других пептидных гормонов. Так, был сконструирован гибридный ген, часть которого взята из гена β -галактазидазы кишечной палочки, а остаток представлял собой фрагмент, кодирующий собственно соматостатин (фрагмент синтезирован химически). Гибридный ген, введенный в бактериальные клетки, направлял синтез белка-химеры, состоящего более, чем на 90 % из аминокислотной последовательности β -галактазидазы, а остальная часть представляла собой соматостатин.

На стыке участка двух исходных генов находился кодон аминокислоты метионина, что позволило обработать гибридный белок бромцианом, разрывающим пептидную связь, образованную метионином. При этом среди продуктов расщепления был обнаружен соматостатин. Данный подход использован и для получения многих пептидных гормонов (А- и В-цепей инсулина, нейропептида лейэнкефалина, брадикинина, ангиотензина и др.).

Генно-инженерными методами за короткий срок были созданы микроорганизмы–суперпродуценты, позволяющие получать с высокими выходами ряд белков вирусов и животных. Созданы штаммы, у которых до 20 % клеточного белка составляют генно-инженерные продукты, например, коровий антиген вируса гепатита В, главный капсидный антиген вируса ящура, ренин теленка, поверхностный антиген вируса гепатита В и др.

4.2. Микробиологическое производство биологически активных белков и гормонов

В организме функционирует множество низко- и высокомолекулярных белков, являющихся регуляторами жизненных процессов. Важное место среди них занимают разнообразные гормоны. Эти вещества давно используют в медицинской практике в терапевтических целях. До недавнего времени их получали из органов и тканей животных и в очень ограниченном количестве – из тканей (крови) человека. Аналогичные лекарственные препараты применяют также в животноводстве. Существует 2 типа гормонов: белково-пептидные и стероидные. Первые состоят из аминокислотных цепей разной длины, вторые – из стероидов. Гормоны, вырабатываемые специализированными клетками, распространяются через кровь по организму, и, взаимодействуя с разными клетками-мишенями, стимулируют в них определенные процессы жизнедеятельности. Гормоны назначают в следующих случаях:

1. для восполнения их нехватки у людей с наследственными дефектами (сахарный диабет, импотенция и т.п.) или заболеваниями, возникшими при жизни;
2. для суперактивации регулируемого гормоном процесса (стимулирование многоплодия и т.д.).

Сдерживает практическое применение гормонов, главным образом в медицине, их дефицит. До начала 80-х гг. XX в. основным источником получения гормонов служили органы и ткани животных и человека, главным образом, донорская кровь, но в последние годы создание любых лекарственных препаратов из органов и крови человека резко ограничилось из-за опасений распространения таким путем вирусов, и, в первую очередь, ВИЧ, вызывающего СПИД.

Белково-пептидные препараты животного происхождения иммунологически отличаются от белков человека, поэтому могут вызывать аллергические реакции, сила которых зависит от индивидуальных особенностей белкового препарата и пациента. Тем не менее, до сих пор люди вынуждены широко применять гормоны животных. Биотехнология, вступившая в эру генетической инженерии, впервые открыла реальные возможности промышленного производства гормонов в масштабах, достаточных для удовлетворения потребностей медицины.

Рассмотрим наиболее ценные для медицины и животноводства продукты, биотехнологическое производство которых налажено или налаживается в промышленных масштабах.

Интерлейкины

Интерлейкины (ИЛ) – вещества белковой или гликопротеидной природы, синтезируемые преимущественно иммунокомпетентными клетками. В настоящее время выделено и охарактеризовано 15 интерлейкинов. К ИЛ, играющим существенную роль в кооперативных взаимодействиях иммунокомпетентных клеток при развитии иммунного ответа, относятся: ИЛ 1, ИЛ 2, ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 6.

ИЛ 1 – цитокин, выделяемый макрофагами, стимулирующий функции Т- и В-лимфоцитов. С их участием активируются Т-хелперы, синтезирующие ИЛ 2, а также β -лимфоциты, трансформирующиеся в плазматические клетки-антителопродуценты. Он является посредником в обеспечении взаимодействия разных защитных противоинфекционных механизмов на уровне организма.

ИЛ 2 – цитокин, синтезируемый Т-лимфоцитами, стимулирует β -лимфоциты при гуморальном иммунном ответе и созревании Т-эффекторов в реакциях клеточного иммунного ответа. ИЛ 2 является ключевым фактором развития иммунного ответа.

ИЛ 4 – фактор стимуляции В-клеток и части Т-лимфоцитов. ИЛ 4 регулирует аллергические реакции организма. С его помощью Т-хелперы влияют на продукцию IgE в процессе развития иммунного ответа. Основными продуцентами ИЛ 4 являются нормальные Т-лимфоциты и Т-клеточные гибридомы.

ИЛ 5 – мультифункциональный цитокин (Т-замещающий фактор), активирующий Т- и В-лимфоциты и эозинофилы. ИЛ 5 является продуктом активированных Т-лимфоцитов.

ИЛ 6 – один из ранних цитокинов, продуцируемый многими типами клеток (В-стимулирующий фактор, фактор роста гибридом/плазмоцитом, Т-лимфоцитами активирующий фактор), участвующий в регуляции функций лимфоцитов, обладающий противовирусным действием.

Биотехнологическое получение интерлейкинов

В качестве продуцентов ИЛ используют культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов, клоны трансформированных (опухолевых) клеток, Т-клеточные гибридомы (продукты гибридизации опухолевых лимфоцитов, способных к нормальному росту, и Т-клеток, синтезирующих определенный ИЛ), а также рекомбинантные микроорганизмы, полученные методами генетической инженерии.

Продуценты ИЛ культивируют *in vitro* в биореакторах, а затем полученный целевой продукт выделяют из культуральной среды, концентрируют и очищают.

С целью увеличения продукции ИЛ культуры клеток стимулируют митогенами (веществами, вызывающими митотическое деление клеток), в качестве которых чаще всего используют: глобулярные растительные белки (фитогемагглютинин и др.) и мурамилдипептид (компонент клеточной стенки бактерий).

При создании рекомбинантных штаммов микроорганизмов – продуцентов ИЛ, гены, контролируемые их синтез, вводят в составе вектора в микробную клетку, выделяют и размножают клон рекомбинантов, а после культивируют полученный продуцент с целью накопления ИЛ.

В качестве рекомбинантных продуцентов используют клетки *E. coli* (ИЛ 1, ИЛ 2) и *Saccharomyces cerevisiae* (ИЛ 2). Причем дрожжи-сахаромицеты в качестве продуцентов ИЛ более перспективны и удобны, т.к. клетки кишечной палочки накапливают ИЛ внутриклеточно, а дрожжи экскретируют в окружающую среду, следовательно, полученный продукт легче отделяется от биомассы клеток и очищается.

Отечественный лекарственный препарат «Ронколейкин» содержит рекомбинантный ИЛ 2 человека, который получают методом биотехнологии из клеток рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae*, в геном которого встроен ген человеческого ИЛ 2.

Интерфероны

Интерфероны (ИНФ) функционально связаны с ИЛ.

ИНФ – группа биологически активных белков или гликопротеинов, синтезируемых клетками организма в ответ на воздействие (индукцию) разными агентами – интерферогенами, к которым относятся вирусы, бактерии, продукты их метаболизма и другие антигены и митогены. В систему ИНФ входят гены и их репрессоры, сами ИНФ, специфические клеточные рецепторы и ферментные системы, активирующиеся под влиянием интерферогенов и самих ИНФ.

Первоначально биологическая роль ИНФ сводилась к способности защищать организм от вирусной инфекции. Впоследствии было показано, что они выполняют и другие важные для организма функции: торможение роста опухолевых клеток за счет усиления цитотоксической активности лимфоцитов, макрофагов, естественных киллеров и стимуляции синтеза фактора некроза опухолей, активация интерфероногенеза (прайминг), стимуляция антителообразования и др.

ИНФ являются видоспецифическими клеточными белками (каждому виду животного свойственен свой белок). ИНФ птиц, грызунов, крупного рогатого скота, человека защищают от вирусов только клетки своего вида, хотя есть и исключение – человеческий ИНФ защищает клетки крупного рогатого скота лучше, чем коровий. ИНФ не является вирусспецифичным белком. Он вырабатывается в ответ на действие многих вирусов.

В зависимости от происхождения различают α -, β - и γ -ИНФ. Кроме того, расшифровка структурных генов позволила получить рекомбинантный ИНФ. По химическому составу α -ИНФ является белком, а β - и γ -ИНФ – гликопротеины.

Человеческий α -ИНФ является продуктом лейкоцитов крови, подвергнутых действию вирусов, используемых в качестве интерфероногенов. β -ИНФ синтезируется в культурах фибробластов (диплоидные клетки соединительной ткани человека) под действием вирусов или синтетической двухцепочечной РНК. γ -ИНФ или иммунный ИНФ выделяют лимфоциты при антигенной стимуляции. Человеческий лимфобластоидный γ -ИНФ получают из лимфобластов, выделенных от больных злокачественной лимфомой Беркита. При этом размножение лимфобластов в культуре стимулируют митогенами. Рекомбинантные ИНФ синтезируются рекомбинантными микробными штаммами (бактериями, дрожжами), полученными с использованием методов генетической инженерии.

α - и β -ИНФ проявляют противовирусное и противоопухолевое действие, γ -ИНФ отличается выраженными иммуномодулирующими свойствами. Действие рекомбинантных ИНФ лишено видовых ограничений и по активности не уступает действию природных ИНФ. Кроме противоопухолевого, противовирусного и иммуномодулирующего действия, ИНФ могут в определенных условиях снижать активность некоторых ферментов (гидролаз), подавлять синтез многих гормонов, участвуя в регуляции и коррекции состояния организма в норме и при патологиях, связанных с нарушениями функций иммунной системы.

Использование ИНФ показано в целом ряде заболеваний. Так, из вирусных инфекций к ним относятся герпетический кератит, кератоконъюнктивит, стоматит, опоясывающий лишай, герпес, энцефалиты, вирусные гепатиты, полиомиелит и др. ИНФ применяют при пересадке органов и тканей в качестве средства, предупреждающего развитие вторичных вирусных осложнений. Эффективность применения лекарственных препаратов ИНФ для терапии ряда онкологических заболеваний зависит от вида опухоли, своевременности начала лечения, схем введения лекарственных препаратов и некоторых других условий.

Способы получения интерферонов

Впервые ИНФ получен в 1967 г Айзексом и Линдеманном в Национальном институте медицинских исследований (Англия).

Получение α -ИНФ основано на способности лейкоцитов образовывать ИНФ под действием вируса. Лейкоциты из периферической крови человека культивируют при температуре 37 °С в течение 16–20 ч на специальной питательной среде, содержащей сыворотку крови человека и вирус-интерфероноген (вирус Сендай). Затем лейкоциты отделяют центрифугированием, вирус инактивируют снижением величины рН среды до 2,5. Нативный ИНФ, находящийся в надосадочной жидкости, осаждают аммония сульфатом, очищают и концентрируют хроматографически на сефадексах. Активность

лекарственного препарата определяется по его противовирусному действию на культуру клеток эмбрионов человека, зараженных вирусами. Через 2–3 суток культивирования с ИНФ фиксируется степень разрушения монослоя клеток. Активность ИНФ выражается в единицах на 1 мг белка. Получение α -ИНФ из лейкоцитов человека имеет ограничения из-за необходимости использования большого количества донорской крови.

β -ИНФ получают из культур фибробластов (клетки соединительной ткани, получаемой из тканей плода или из материала передней плоти при обрезании младенцев), выращенных в монослое *in vitro*. Фибробласты удается поддерживать в культуре, поэтому они пригодны для массового производства ИНФ. В данном случае в качестве интерферогена используют двухцепочечную РНК. Увеличению выхода ИНФ способствуют ингибиторы метаболизма, например, противоопухолевый антибиотик актиномицин Д, ингибирующий синтез РНК. β -ИНФ накапливается в культуральной жидкости в небольших количествах (1 мг на 10 л). Культура клеток-продуцентов через 2–3 суток отмирает. Предложенная технология производства ИНФ отличается простотой по сравнению с их получением из лейкоцитов.

Выход γ -ИНФ, синтезируемого в культурах иммунных Т- или В-лимфоцитов, еще ниже по сравнению с α - и β -ИНФ. Однако γ -ИНФ обладает высокой противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Человеческий лимфобластоидный ИНФ получают в глубокой суспензионной культуре лимфоидных клеток, выделенных от больных лимфомой. Эти клетки можно культивировать в биореакторах объемом до 500 л. Для индукции синтеза ИНФ используют вирус Сендай, а для увеличения его выхода лимфобласты обрабатывают 5-бромдезоксисуридином или кортикостероидами, замедляющими все реакции метаболизма клеток, кроме синтеза ИНФ. При добавлении указанных антиметаболитов, клетка переключается практически целиком на синтез ИНФ и через определенный промежуток времени погибает.

В целом все методы получения ИНФ характеризуются: низкими выходами целевого продукта, высокой стоимостью продукции (40–50 долларов за 1 млн. единиц), при этом степень очистки лекарственного препарата, как правило, недостаточна (хотя в случае лимфобластного ИНФ ее удалось повысить с 0,1–10 до 50 %). В этой связи большие надежды возлагались на получение ИНФ с применением технологии рДНК.

В качестве рекомбинантных продуцентов первоначально использовали клетки *E. coli*, накапливающие продукт внутриклеточно, что осложняло его выделение и очистку. Более перспективными оказались бактерии рода *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas putida*, способные секретировать рекомбинантные белки в окружающую среду. Из эукариот хорошими продуцентами генно-инженерного ИНФ являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые растут на доступных питательных средах, легче отделяются от культуральной жидкости, не подвергаются воздействию бактериофагов. При использовании данного вида дрожжей производство ИНФ возросло в 10 раз. *Saccharomyces cerevisiae* обладают преимуществами при синтезе гликопротеидов высших организмов, в том числе и ИНФ, поскольку присоединение углеводных групп (гликозилирование) в них осуществляется по тому же механизму, что и в клетках животных.

Принципиальная технологическая схема получения рекомбинантного ИНФ включает следующие этапы:

1. Выделение информационной РНК (иРНК), несущей информацию о структуре молекулы ИНФ (РНК выделяют после индукции синтеза ИНФ).
2. Получение кДНК на матрице иРНК.
3. Встраивание кДНК в векторную плазмиду с участием рестриктаз и лигаз и получение рДНК, содержащей ДНК вектора с генетическими маркерами и ДНК, кодирующую синтез целевого продукта.
4. Трансформация рДНК в рецепиентную (пермиссивную) микробную клетку.

5. Получение клонов рекомбинантных продуцентов, способных синтезировать ИНФ (на плотной питательной среде).

6. Размножение клоновой культуры – продуцента в жидкой питательной среде.

7. Отделение клеток из культуральной жидкости путем центрифугирования.

8. Выделение целевых белков из нативного раствора или лизата биомассы продуцента (например, осаждением сульфатом аммония).

9. Очистка ИНФ после растворения осадка с помощью аффинной хроматографии при использовании сорбента, связанного с моноклональными антителами к ИНФ. При пропускании раствора, содержащего целевой продукт и балластные вещества, через колонку с иммуносорбентом происходит высокоспецифическое связывание антигена (ИНФ) с моноклональными антителами к нему, все прочие вещества не задерживаются. Затем ИНФ элюируют слабой кислотой, происходит диссоциация комплекса «антиген-антитело».

Выполнение 1–5 этапов осуществляется в лабораторных условиях, последующие этапы выполняются на производственных установках. Выход рекомбинантного ИНФ значительно выше, чем при использовании культур лимфоцитов, лейкоцитов или фибробластов. Так, для получения 60 мкг лейкоцитарного ИНФ нужно 100 л крови или 1 л культуральной жидкости микроорганизма-рекомбинанта.

Субстанции ИНФ, как большинство белков, являются лабильными продуктами, независимо от источника их получения или степени очистки. Иммуномодуляторная активность ИНФ, прежде всего, проявляется через его пространственную организацию, т.е. через вторичную, третичную и четвертичную структуры. Изменение четвертичной структуры ИНФ приводит к тому, что организм воспринимает его как чужеродный агент и отвечает выработкой антител, что снижает активность ИНФ. Инактивация в желудочно-кишечном тракте делает невозможным пероральное применение ИНФ. Препараты для парентерального введения получают методом лиофильной сушки. При этом в качестве криопротектора используют сывороточный альбумин человека. Мазевые формы ИНФ в качестве гидрофильного носителя содержат гель алюминия гидроксида, загустителя и пленкообразователя – поливиниловый спирт, стабилизатора – декстрана сульфат. В суппозитории и мази с рекомбинантным ИНФ включают препараты антиоксидантного действия – α -токоферола ацетат и аскорбиновую кислоту.

В то же время следует отметить, что существенным недостатком длительного применения рекомбинантных ИНФ является формирование антиинтерфероновых антител, появление которых сводит на нет трудоемкую и дорогостоящую терапию. Кроме того, при индивидуальной непереносимости, передозировке или длительном применении ИНФ могут возникать побочные эффекты:

✓ гриппоподобный синдром (ухудшение общего состояния, повышение температуры тела, озноб, гипергидроз, слабость, утомляемость, сонливость, апатия, астения, миалгии, артралгии, головные боли);

✓ транзиторная гипо- и гипертензия, отечность, цианоз, аритмии и тахикардия;

✓ диспептические явления (потеря аппетита, тошнота, рвота, боли в животе, вздутие живота, усиление моторики, изжога);

✓ кожные высыпания и зуд кожи, крапивница, сухость кожных покровов, выпадение волос;

✓ лейко- и тромбоцитопения, снижение гемоглобина и показателя гематокрита;

✓ расстройства периферической нервной системы и др.

Перечисленные побочные эффекты носят, как правило, транзиторный характер и быстро исчезают после отмены ИНФ. Более серьезный характер имеют осложнения при длительном применении ИНФ, связанные с нарушениями функций щитовидной железы,

угнетением костномозгового кроветворения, ишемическим колитом, ухудшением слуха, депрессивным синдромом.

Индукторы интерферонов

К началу XXI в. открыто и изучено около 1500 вирусов, из которых более 500 вызывают разные заболевания человека (от местных поражений до генерализованных инфекций), причем не менее половины из них убиквитарны, т.е. распространены практически повсеместно. Многочисленные представители семейства вирусов (миксовирусы, парамиксовирусы, риновирусы, энтеровирусы и т.п.) являются причиной наиболее распространенных инфекций (грипп, герпес, гепатиты, корь, паротит и др.).

В последнюю четверть XX в. изменилось традиционное отношение к вирусам только как к агентам, вызывающим классические инфекции. Доказана их роль в этиологии и патогенезе ряда аутоиммунных (системная красная волчанка и др.), аллергических (сенная лихорадка и др.), онкологических и других заболеваний. Сегодня с определенной долей уверенности можно сказать, что в основе до 90 % всей патологии человека лежит инфекционная природа, инфекционный агент. Общеизвестно, что профилактика легче и дешевле лечения, а лечение острых форм на ранних этапах дешевле, чем лечение запущенных и тяжелых форм инфекционных болезней и их осложнений. Все это определяет актуальность научно-обоснованного применения существующих и создания новых этиотропных препаратов, пригодных для профилактики и терапии вирусных инфекций.

По характеру действия и клинической значимости лекарственные препараты, применяемые в настоящее время для лечения вирусных инфекций, могут быть разделены на 4 основные группы:

- ✓ этиотропные, действующие на возбудителя заболевания;
- ✓ иммуномодулирующие, корригирующие нарушение системы иммунитета, возникающие и развивающиеся в процессе болезни;
- ✓ патогенетические, направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, сосудистыми поражениями, органными нарушениями, аллергическими реакциями, а также на профилактику бактериальных осложнений;
- ✓ симптоматические, купирующие сопутствующие симптомы заболевания (головная боль, бессонница, кашель и др.).

Очевидно, что лучшие результаты терапии могут быть получены при комплексном использовании перечисленных средств, учитывая этиологию заболевания, нарушение систем иммунитета и ИНФ, патогенетические сдвиги и конкретную симптоматику. Отсюда следует учитывать, что для рациональной терапии вирусных инфекций в принципе невозможно создать один лекарственный препарат универсального действия, т.к. он таит в себе опасность возникновения осложнений и/или развития хронических рецидивирующих форм заболевания.

Все известные в настоящее время противовирусные средства, с помощью которых возможны терапия и неспецифическая профилактика разных инфекций, в соответствии с их химическим составом и механизмом действия целесообразно классифицировать на 4 группы: химиопрепараты, ИНФ, индукторы ИНФ и иммуномодуляторы.

Химиопрепараты – лекарственные средства этиотропной терапии, ИНФ и их индукторы обладают комбинированным (этиотропным и иммуномодулирующим) действием, а иммуномодуляторы используются для иммунотерапии и иммунокоррекции.

Индукторы ИНФ – разнородное по составу семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, объединенных способностью вызывать в организме образование собственного (эндогенного) ИНФ. Индукторы ИНФ (табл. 2) обладают противовирусной, иммуномодулирующей и другой характерной для ИНФ активностью.

Классификация индукторов ИНФ, пригодных для клинического использования

Химическая природа	Лекарственный препарат
А. Синтетические соединения	
Низкомолекулярные (ароматические углеводы): флуореноны, акриданоны	Амиксин, Циклоферон, Неовир
Полимеры	Полудан, Полигуацил, Ампилиген
Б. Природные соединения	
Низкомолекулярные: полифенолы (производные госсипола)	Мегасин, Кагоцел, Саврац, Рогасин
Полимеры: двуспиральные РНК	Ларифан, Ридостин

В настоящее время есть все основания полагать, что в недалеком будущем область клинического применения индукторов ИНФ будет значительно расширена, и их смогут, подобно ИНФ, использовать при ОРВИ, герпесе, вирусных гепатитах, ВИЧ-инфекции, энцефалитах, бешенстве, для предупреждения вторичных вирусных осложнений, возникающих в результате применения цитостатиков и иммунодепрессантов.

Индукторы ИНФ относятся к новому поколению лекарственных препаратов, применение имеет ряд преимуществ перед рекомбинантными ИНФ:

- ✓ не обладают антигенностью;
- ✓ естественный (но стимулированный) синтез эндогенного ИНФ не вызывает гиперинтерферонемии, которая нередко возникает при использовании рекомбинантных ИНФ, приводя к тяжелым побочным явлениям;

- ✓ однократное введение индукторов ИНФ обеспечивает длительную циркуляцию ИНФ на терапевтическом уровне. Для достижения такого уровня экзогенных ИНФ требуется многократное введение высоких доз рекомбинантных ИНФ. Некоторые индукторы ИНФ обладают уникальной способностью запускать синтез ИНФ в определенных популяциях клеток, что имеет существенные преимущества перед поликлональной стимуляцией иммуноцитов рекомбинантными ИНФ;

- ✓ обладают иммуномодулирующими свойствами и сочетаются не только с рекомбинантными ИНФ, но и с другими противовирусными лекарственными препаратами, вызывая при их сочетанном применении синергидный эффект.

- ✓ широко применяемые рекомбинантные ИНФ, как правило, являются лекарственными препаратами α -ИНФ, что значительно ограничивает их противовирусные свойства, т.к. для эффективной противовирусной защиты необходимо наличие всех трех классов ИНФ, синтез которых и вызывается применением индукторов интерфероногенеза.

Гормон роста

Гормон роста (соматотропный гормон, СТГ) – белок, секретируемый передней долей гипофиза позвоночных животных. Его наличие в экстрактах из гипофиза было установлено Эвансом и Дж. Лонгом в 1921 г., но лишь в 1944 г. он был получен в виде очищенного препарата, а в 1948 г. – в кристаллическом виде.

В гипофизе человека содержится 3,7–6 мкг СТГ. По химической природе он представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 191 аминокислотного остатка.

СТГ обладает выраженным анаболическим действием, влияет на все клетки организма, повышая в них уровень биосинтетических процессов, усиливает биосинтез белков, ДНК, РНК и гликогена, способствует мобилизации жиров из жировых депо и ускоряет распад высших жирных кислот и глюкозы. СТГ улучшает функции почечных канальцев и нормализует минеральный и водный обмен, что способствует росту организма, но, в конечном счете, действие СТГ значительно шире, нежели только регуляция роста. Исследования на молекулярном уровне показали, что СТГ стимулирует действие РНК-полимераз и полирибосомного аппарата клетки. Как свидетельствуют

опыты с меченым фосфором, самым ранним эффектом действия СТГ является синтез в ядрах клеток предшественников мРНК и рРНК. Вместе с тем, велико его влияние на проницаемость клеточных стенок, т.к. фонд внутриклеточных аминокислот в присутствии СТГ значительно возрастает, что способствует новообразованию белка. СТГ повышает содержание в крови особых стимулирующих рост факторов – соматомединов.

СТГ человека, синтезированный в специально сконструированных клетках бактерий, характеризуется рядом преимуществ: доступен в больших количествах, его лекарственные препараты являются биохимически чистыми и свободными от вирусных загрязнений.

Биосинтез соматотропина осуществлен Гедделем с сотр. Поскольку при синтезе ДНК на мРНК гормона с последующим превращением ее в двухнитиевую форму получается ген, кодирующий предшественник соматотропина, который расщепляется в бактериальных клетках с образованием активного гормона, исследователи избрали следующий подход. На первом этапе клонировали двухнитиевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23-х аминокислот. Затем клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам с 1-й по 23-ю и, наконец, 2 полученных фрагмента объединили вместе, и «подстроили» к паре промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры или 1 % от растворенных белковых клеток генетически сконструированного штамма *E. coli*.

СТГ, синтезированный в бактериях, обладал нужной молекулярной массой и не был связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было отщепить. Однако синтетический СТГ содержал на N-конце полипептидной цепи дополнительный остаток метионина. Эта лишняя аминокислота удалялась при длительном выращивании *E. coli*. В июне 1978 г. исследователи компании «Генентек» представили данные, доказывающие, что СТГ с дополнительным остатком метионина, синтезированный в генетически сконструированных клетках бактерий, обладает биологической активностью нативного гормона. Они провели сравнение стимуляции роста крыс с удаленным гипофизом СТГ, синтезированным в клетках бактерий, и лекарственным препаратом, полученным из гипофиза человека. Прирост массы и рост больших берцовых костей был одинаковым, как для обоих лекарственных препаратов, так и для их смеси.

Инсулин

Инсулин (от гист. *insulae pancreaticae* – панкреатические островки) – белково-пептидный гормон, синтезируемый в β -клетках островков поджелудочной железы; является универсальным анаболическим гормоном, необходимым для роста и развития организма, подобно СТГ гипофиза, синергистом которого в этом отношении он является. Одним из наиболее значимых направлений фармакологического действия инсулина является его гипогликемическое действие. Инсулин является одним из наиболее полно изученных гормонов поджелудочной железы, действие которого связано с регуляцией содержания сахара в крови. Считают, что инсулин осуществляет вспомогательную функцию при переносе глюкозы из крови через стенки сосудов к мускульной ткани, где она расходуется для энергетических целей, или к клеткам печени, где из нее синтезируется резервный полисахарид – гликоген. Предполагают, что инсулин способствует удалению глюкозы из крови в результате его специфической ориентации на поверхности клеточной оболочки, что облегчает проникновение через нее глюкозы из крови. При недостатке инсулина концентрация глюкозы в крови начинает повышаться, т.к. она не может свободно диффундировать внутрь клеток. В последнее время считают, что инсулину принадлежит важная роль в регуляции биосинтеза глюкозы в организме.

Химическая структура инсулина установлена Сэнджером. Инсулин представляет собой циклический гетерогенный пептид, состоящий из двух цепей, соединенных двумя сульфидными мостиками. В одной из цепей, кроме того, имеется внутренний

дисульфидный мостик. В цепи А содержится 21, а в цепи В – 30 аминокислотных остатков.

Со времени проведения первых опытов по использованию инсулина для лечения сахарного диабета в 1922 г., этот гормон выделяли из поджелудочной железы животных (коров и свиней).

Существует несколько причин, по которым целесообразна разработка методов крупномасштабного производства и выпуск на рынок инсулина человека: среди них коммерческие, эмоциональные факторы, потребности развития науки и возможные преимущества при лечении.

Инсулин, как коров, так и свиней, немного отличается по аминокислотной последовательности от инсулина человека. Особенно близки человеческий и свиной инсулины: у последнего лишь С-концевой треонин В-цепи заменен на аланин. Коровий и человеческий инсулины различаются по трем аминокислотным остаткам, и именно этими отличиями определяется повышенная иммуногенная активность коровьего инсулина по сравнению со свиным. Почти у всех больных, которых лечат традиционным методом, т.е. вводят им коровий инсулин, в крови появляются антитела к нему. Антигенные свойства инсулина частично определяются примесями в его лекарственных препаратах. Скорее всего, именно образованием антител к инсулину объясняются некоторые побочные эффекты (атрофия подкожной жировой прослойки) при инъекциях коровьего инсулина. В случае высокоочищенного инсулина свиньи такие эффекты, как правило, отсутствуют. Антитела к инсулину вызывают его инактивацию в кровотоке, так, что больному приходится вводить большие дозы, чем это необходимо. Кроме того, антитела влияют на продолжительность биологического действия введенного инсулина. Можно предположить, что инсулин человека будет еще менее иммуногенным, чем свиной.

Поскольку количество больных сахарным диабетом и соответственно потребность в инсулине неуклонно растут, то вполне возможно, что доступность его в будущем уменьшится вследствие нехватки исходного сырья – поджелудочной железы животных. Из-за чисто эмоциональных факторов также лучше использовать инсулин человека, чем какого-либо животного.

Ряд производителей инсулина во главе с фирмой «Eli Lilly & Co» использовали как основу для производства инсулина человека технологию рекомбинантных ДНК. Согласно схеме, разработанной «Eli Lilly & Co» в сотрудничестве с фирмой «Genentech Inc.», на первом этапе воссоздают последовательность ДНК по аминокислотной последовательности инсулина, раздельно синтезируя искусственные гены его А- и В-цепей. На 5'-конце каждого из них располагается кодон метионина, который в синтезированном белке оказывается N-концевым, а на 3'-конце – терминирующие последовательности. Каждый из генов встраивается затем в ген β -галактозидазы плазмид, а их, в свою очередь, вводят в клетки *E. coli*. Поскольку бактерии культивируют на питательной среде с галактозой, то в них индуцируется синтез β -галактозидазы, а вместе с ней А- и В-цепей инсулина, присоединенных через остаток метионина. После лизиса бактерий и обработки бромцианом, который специфически расщепляет белки по остатку метионина, цепи инсулина отделяют от β -галактозидазы (инсулин метионина не содержит). Затем проводят очистку цепей и их объединение, в результате образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и пирогенных веществ, по физическим свойствам он неотличим от инсулина из поджелудочной железы человека и в тест-системе проявляет полную биологическую активность.

Впоследствии был испытан альтернативный метод: синтезировали ген молекулы-предшественника, проинсулина, который вводили в *E. coli*. После очистки проинсулина его расщепляли трипсином и β -карбоксипептидазой и получили нативный инсулин.

Инсулин человека, полученный с помощью *E. coli*, оказался первым «генно-инженерным белком», испытанным на людях. В опытах со здоровыми добровольцами

установлено, что он безопасен, во всяком случае при краткосрочном применении (не вызывает аллергических и иных нежелательных реакций) и обладает практически одинаковой с инсулином свиньи способностью снижать уровень глюкозы в крови при его введении под кожу и внутривенно. В настоящее время такой инсулин человека получают множество диабетиков во всем мире. Этому предшествовали клинические испытания, в ходе которых изучались изменения метаболизма и иммунологические эффекты. В настоящее время это уже обычный метод лечения.