

А.А.ЧИРКИН

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Репозиторий ВГУ

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

**Учебно-методический комплекс для студентов биологического
факультета**

Репозиторий ВГУ

УДК 575 (075.8)
ББК 28.04я73
Ч 65

Автор: заведующий кафедрой химии УО «ВГУ им. П.М.Машерова», доктор биологических наук, профессор **А.А.Чиркин**

Рецензент: доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии Витебского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук **Е.О. Данченко**

Учебно-методический комплекс дисциплины «Введение в биотехнологию» для студентов Биологического факультета включает программу по биотехнологии, рабочий план, тематику лекций и лабораторных занятий, теоретические основы предмета, лабораторный практикум, вопросы для итогового контроля (зачет). Комплекс призван оказать помощь студентам биологических специальностей в изучении биотехнологии.

УДК 575 (075.8)
ББК28.04я73

© Чиркин А.А., 2004
© УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2004

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел	Стр.
Оглавление	1
Введение	2
Введение в биотехнологию (Программа)	3
Литература	7
История развития молекулярной биотехнологии	8
Промышленная биотехнология	9
Понятие о метаболизме	13
Продуценты и селекция	18
Биотехнологическое сырье	20
Объекты молекулярной биотехнологии	22
Технология рекомбинантных ДНК	29
Полимеразная цепная реакция	37
Ферменты	38
Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов	46
Экологически чистая энергия. Биогаз.	57
Деградация ксенобиотиков с помощью микроорганизмов	60
Утилизация целлюлозы	62
Питание сельскохозяйственных животных	63
Получение ферментативных препаратов	64
Молекулярная биотехнология и питание	66
Бродильное производство	77
Химия пищевых веществ в питании человека	85
Продукты из молока	86
Хлебные продукты	91
Молекулярная биотехнология и производство коммерческих продуктов	93
Биотехнология и растениеводство	98
Трансгенные животные, птицы, рыбы	106
Контроль применения методов молекулярной биотехнологии	111
Практикум	113
Вопросы итогового контроля	131

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методический комплекс дисциплины «Введение в биотехнологию» составлен с ориентацией на конечный результат обучения студентов на биологическом факультете с целью формирования знаний о современных биотехнологических процессах, основанных на методах рекомбинантных ДНК, а также на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных органелл. В основе программы лежат представления о молекулярной биотехнологии, которая служит для создания нового продукта или получение уже известного продукта в промышленных масштабах с помощью биологических систем *in vitro* и *in vivo*. Рассмотрены вопросы практического применения молекулярной биотехнологии на примерах производства продуктов питания (выращивание водорослей, дрожжей и бактерий для получения веществ, повышающих биологическую и энергетическую ценность пищи), повышения продуктивности сельскохозяйственных растений и животных, производства фармацевтических субстанций, биологической очистки объектов окружающей среды, совершенствования лабораторных методов обследования биологических объектов экосистем. Программа основана на учебно-исследовательском принципе изучения предмета.

Весь материал разбит на 4 раздела. В первом разделе излагаются основы молекулярной биологии, во втором – основной упор сделан на молекулярную биотехнологию микроорганизмов, в третьем – рассмотрены вопросы биотехнологии эукариотических систем, в том числе и человека и в четвертом разделе приведена законодательная база использования генноинженерных продуктов в пищевой и фармацевтической промышленности, применения рекомбинантных организмов в сельском хозяйстве, понятия о правилах GMP и GLP (требования производства генноинженерных продуктов и их добротного испытания).

При изложении теоретических основ спецкурса автор широко использовал четыре уникальных учебных пособия: Б.Глик, Дж.Пастернак «Молекулярная биотехнология. Принципы и применение». М.: Мир, 2002. – 589 с.; Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина «Основы биотехнологии». М.: АСАДЕМА, 2003. – 208 с.; О.В. Кислухина «Ферменты в производстве пищи и кормов». М.: ДеЛи принт, 2002 – 336 с.; В.Н.Голубев, И.Н.Жиганов «Пищевая биотехнология». М.: ДеЛи принт, 2001. – 123 с.

Все замечания и предложения будут с благодарностью приняты и учтены в дальнейшей работе по совершенствованию спецкурса.

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

(для специальности Н.06.01.00 – экология, специализация Н.06.01.01 – общая экология и Н.06.01.03 – физико-химический анализ объектов окружающей среды)

Программа «Введение в биотехнологию» для студентов биологических факультетов университетов разработана заведующим кафедрой химии Витебского государственного университета им. П.М. Машерова доктором биологических наук, профессором Чиркиным А.А. Программа «Введение в биотехнологию» прорецензирована: зав. кафедрой экологии и охраны природы ВГУ им. П.М.Машерова доцентом А.М.Дорофеевым и профессором кафедры химии ВГУ им. П.М.Машерова доктором биологических наук В.И.Гидрановичем.

ЗАДАЧИ ПРЕПОДАВАНИЯ КУРСА

В результате изучения введения в биотехнологию студент должен:

знать

- биологические агенты, используемые в биотехнологии;
- принципы культивирования клеток;
- сущность методов молекулярной генетики, а также технологии рекомбинантных ДНК;
- принципы работы с иммобилизованными ферментами;
- этапы выделения целевых продуктов и возможные пути загрязнения внешней среды

уметь

- пользоваться языком молекулярной биотехнологии и справочными руководствами;
- выбрать биологический объект, составить алгоритм биотехнологических работ, обосновать метод наиболее эффективной очистки целевого продукта;
- применить методы спектрофотометрии, тонкослойной и колоночной хроматографии, определения активности и количества ферментов, выделения и очистки целевого продукта.

СОДЕРЖАНИЕ КУРСА

История молекулярной биотехнологии. Молекулярная биотехнология как разделы молекулярной биологии, молекулярной генетики бактерий, энзимологии, с одной стороны, и промышленной микробиологии и химической инженерии, с другой. Цели молекулярной биотехнологии: повышение урожайности сельскохозяйственных культур, создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, создание пород сельскохозяйственных и других животных с улучшенными наследуемыми признаками, переработка отходов, загрязняющих окружающую среду, получение продуктов питания и повышение биологической ценности пищи, получения низкомолекулярных биорегуляторов и биополимеров для применения в фармации и медицине. Возможные негативные эффекты развития молекулярной биотехнологии.

Ферменты в молекулярной биотехнологии. Иммобилизованные ферменты.

I. Биологические системы, используемые в молекулярной биотехнологии: прокариоты, эукариоты; бактерии *Escherichia coli*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, культуры эукариотических клеток (насекомых, растений, млекопитающих). Ферменты. Требования, предъявляемые к биообъектам. Культивирование, основные компоненты питательных сред. Принципы селекции микроорганизмов. Биотехнологическое сырье, учитывая побочные продукты производства. Источники минерального питания. Комплексные обогатители сред. Среды для культивирования микроорганизмов. Кислород и вода. Пенообразователи и пеногасители. Значение асептики в биотехнологии.

Матричные синтезы: репликация, транскрипция, трансляция. Особенности регуляции транскрипции у бактерий и эукариот. Представления о технологии рекомбинантных ДНК. Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотические клетки. Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем. Дрожжевые системы экспрессии. Системы экспрессии с использованием культур клеток насекомых (рекомбинантные бакуловирусы). Системы экспрессии для работы с клетками млекопитающих.

II. Биотехнологический процесс культивирования микроорганизмов. Рост и развитие микроорганизмов. Основные показатели процесса ферментации. Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов. Оценка процесса ферментации. Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов. Этапы роста культуры – латентная, ускорения, логарифмическая, замедления, стационарная, отмирания (преимущественный синтез белков в логарифмической фазе, а низкомолекулярных продуктов – во время стационарной фазы). Типы биореакторов: с механическим перемешиванием, барботажные колонны, эрлифтные.

Инженерная энзимология. Строение ферментов, катализ, выделение ферментов. Источники ферментов (животного происхождения, растительного происхождения). Имобилизованные ферменты.

Утилизация крахмала и сахаров, повышение эффективности производства фруктозы и этанола. Бродильные производства (алкогольные напитки, пиво, вино, спирт, сидр, уксус). Мультиплазмидные организмы, способные утилизировать несколько соединений. Утилизация целлюлозы через выделение прокариотических и эукариотических целлюлазных генов. Повышение образования силоса с использованием *Lactobacillus plantarum*. Белок одноклеточных организмов (БОО) – белковые продукты, синтезируемые монокультурой микробных клеток и используемые в качестве пищевых добавок или корма для скота (подкислители, аминокислоты, витамины и пигменты, усилители вкуса, жиры и масла, растительный клей и загустители, подсластители, пищевые кислоты – уксусная, лимонная, молочная).

Пищевые аспекты биотехнологии: получение пищевого белка, молочные продукты (казеины, казеинат натрия, казеит и копреципитаты,

концентраты сывороточных и других белков, методы приближения молочных смесей к женскому молоку, брожение лактозы и коагуляция казеина, производство кисломолочных продуктов, сычужное свертывание молока и производство сыра), хлебопродукты, бродильные производства, пищевые добавки, консервированные овощи (продукты из сои, применение ферментов при выработке фруктовых соков)

. Границы применения биотехнологии в пищевой промышленности. Перспективы использования продукции биотехнологии: аминокислоты, олигопептиды, ферменты, витамины, терпены и родственные соединения, органические кислоты, полисахариды.

Представление о биогеотехнологии (обогащение полезных ископаемых и удаление мешающих и опасных веществ, увеличение добычи нефти) и о биоконверсии энергии (биофотолиз воды, биогаз, биологические топливные элементы).

Бактерии, стимулирующие рост растений: непосредственно путем поставки фиксированного азота, хелатированного железа, фитогормонов, фосфатов (штаммы *Rhizobium*, симбиоз с растениями, клубеньки на корнях) и опосредованно через подавление роста фитопатогенных микроорганизмов.

Микробные инсектициды. Токсины, синтезируемые *Bacillus thuringiensis*, клонирование генов токсинов и возможность их экспрессии. Бакуловирусы как инсектицидные агенты (введение гена нейротоксина, смертельного для насекомых).

Методы иммунодиагностики: ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA). Микробиологическое производство лекарственных средств: интерфероны, соматотропин, моноклональные антитела как лекарственные средства, производство антител с помощью *E.coli*, перспективы лекарств против ВИЧ. Вакцины – субъединичные, аттенуированные, «векторные».

Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения низкомолекулярных соединений – витаминов, аминокислот, антибиотиков и др. Микробиологический синтез каучука.

Биодеградация токсичных соединений и утилизация биомассы. Метаболические пути биодеградации ксенобиотиков.

III. Культуры растительных клеток и тканей. Фертильные растения, все клетки которых несут чужеродный(е) ген(ы) (трансгенные растения). Получение трансгенных растений не содержащих маркерных генов. Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам. Получение растений, противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению. Изменение свойств растений: окраски цветков, пищевой ценности, вкуса, внешнего вида плодов. Трансгенные растения, способные синтезировать ценные для промышленности и сельского хозяйства белки и химикаты.

Трансгенные животные (молочная железа – «биореактор», наследуемая устойчивость к бактериальным, вирусным инфекциям и паразитарным инвазиям); трансгенные овцы, козы и свиньи (синтез человеческого

гемоглобина); трансгенные птицы, рыбы. ПЦР как метод обнаружения трансгена, перспективы и потенциальные опасности.

IV. Контроль применения биотехнологических методов: экспериментов с рекомбинантными ДНК, производства и потребления пищевых продуктов и пищевых добавок, высвобождения генетически модифицированных организмов в окружающую среду. Общее представление о правилах добротного и безопасного производства (GMP – Good Manufacturing Practice), доклинического испытания (GLP – Good Laboratory Practice) и клинического испытания (GCP – Good Clinical Practice) продуктов молекулярной биотехнологии, применяемых для улучшения качества жизни человека.

В соответствии с утвержденным учебным планом для биологического факультета по специальности «Экология» преподавание дисциплины «Введение в биотехнологию» предусматривается 60 часов, из них 36 аудиторных:

Название факультета	Семестр	Всего часов	Лекции	Лабораторные занятия	СРКП	Экзамен, зачет
Биологический	7	36	26	10	24	Зачет

Примечание: СРКП – самостоятельная работа под контролем преподавателя.

ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ЛЕКЦИЙ ДИСЦИПЛИНЫ «ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ» ДЛЯ СТУДЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ»

№	СОДЕРЖАНИЕ	Часы
1	Введение в молекулярную биотехнологию	2
2	Биологические системы, используемые в молекулярной биотехнологии	2
3	Технология рекомбинантных ДНК, экспрессия генов	2
4	Биотехнологическая энзимология	2
5	Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов	2
6	Молекулярная биотехнология микробиологических систем в экологии и диагностике	2
7	Молекулярная биотехнология микробиологических систем и питание	2
8	Бродильное производство	2
9	Продукты питания на основе молока и хлеб	2
10	Молекулярная биотехнология микробиологических систем и производство коммерческих продуктов	2
11	Трансгенные растения	2
12	Трансгенные животные	2
13	Контроль применения биотехнологических методов	

ИТОГО: Лекции 26 часов.

ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ ДИСЦИПЛИНЫ «ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ»

№	Наименование раздела, темы, элемента	К-во часов	Примечание
1	Белки. Качественные и количественные методы	2	

	определения аминокислот и белков. Методы изучения физико-химических свойств белков.		
2	Ферменты. Определение специфичности ферментов. Иммуобилизация ферментов. Методы выделения и количественного определения количества и активности ферментов. Методы изучения кинетических свойств ферментов.	4	
3	Биохимическая оценка продуктов питания: физико-химические свойства, содержание витаминов.	4	

ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

Бейли Д., Оллис Д. Основы биохимической инженерии, в 2-х частях. М.: "Мир", 1989.

Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райнулис Е.П. Биотехнология. М.: "Агропромиздат", 1990.

Биотехнология, в 8-ми томах. Под ред. Н.С.Егорова, В.Д.Самуилова. М.: "Высшая школа", 1987-1988.

Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.: «Академия», 2003.

Елинов Н.П. Основы биотехнологии. СПб: "Наука", 1995.

Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов. М.: «Высшая школа», 1990.

Виестур У.Э., Шмите И.А., Жилевич А.В. Биотехнология: биотехнологические агенты, технология, аппаратура. Рига: "Зинатне", 1987.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: "Мир", 2002.

Голубев В.Н., Жиганов И.Н. Пищевая биотехнология. М.: ДеЛи принт, 2001.

Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. Санкт-Петербург: ГИОРД, 2003.

Кислухина О., Кюдулас И. Биотехнологические основы переработки растительного сырья. Каунас: «Технология», 1997.

Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов. М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.

Чиркин А.А. Практикум по биохимии. Минск: ООО «Новое знание», 2002.

Чиркин А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК. Витебск: Издательство УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2004.

Harvey W. Blanch, Douglas S. Clark. Biochemical Engineering. N.-Y.: Marcel Dekker, 1997.

Wong C.H., White G.M. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. Trowbridge: Pergamon, 1995.

Дополнительная литература

Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. М.: "Агропромиздат", 1987.

Гриневич А.Г., Босенко А.М. Техническая микробиология. Мн.: "Вышэйшая школа", 1986.

Кулаковская Т.В. Лабораторный практикум по биотехнологии: Учеб. пособие. Мн.: БГПУ им. М.Танка, 2001. – 45 с.

Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: "Просвещение", 1987.

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.:Минздрав РФ, ЗАО «ИИА Ремедиум», 2000.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ СОДЕРЖАНИЕ КУРСА

История развития молекулярной биотехнологии представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Историческая справка о становлении молекулярной биологии (по Б.Глик, Дж.Пастернак, 2002)

Дата	Событие
1917	Карл Эреки ввел термин «биотехнология» на основе промышленного выращивания свиней с использованием сахарной свеклы
1943	Промышленное производство пенициллина
1944	Генетический материал – ДНК (Эвери, МакЛеод, МакКарти)
1953	Двойная спираль ДНК (Уотсон и Крик)
1966	Расшифрован генетический код
1970	Выделена первая рестриктаза (эндонуклеаза)
1972	Синтез полноразмерного гена тРНК (Корана)
1973	Создание технологии рекомбинантных ДНК (Бойер и Коэн)
1975	Описание технологии получения моноклональных антител (Колер, Мильштейн)
1976	Первые руководства для работы с рекомбинантными ДНК
1976	Методы определения нуклеотидной последовательности ДНК
1978	Произведен человеческий инсулин, полученный с помощью <i>E. coli</i>
1983	Описано применение Ti-плазмиды для трансформации растений
1988	Генноинженерным путем получена высокоопухолевая линия мышей
1988	Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)
1990	Программа испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека (США)
1990	Начало проекта «Геном человека»
1996	Определение нуклеотидной последовательности всех хромосом эукариотического микроорганизма (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
1997	Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки

Термин «биотехнология» был предложен в 1917 году венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы.

По определению Эреки, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты». В 1961 году по инициативе шведского микробиолога Карла Герена Хеден было предложено название журналу «Биотехнология и биоинженерия», что определило официальное признание термина – биотехнология, т.е. наука в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов». Фундаментом для этой науки явились микробиология, биохимия и химическая инженерия.

Промышленная биотехнология. Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используются микроорганизмы, обычно состоит из трех ключевых этапов.

1. Исходная обработка: обработка сырья таким образом, чтобы его можно было использовать как источник питательных веществ для микроорганизма-мишени.

2. Ферментация и биотрансформация: рост микроорганизма-мишени в большом (обычно более 100 л) биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация).

3. Конечная обработка: очистка нужного вещества от компонентов культуральной среды или от клеточной массы.

По Т.А.Егоровой и соавт. (2003) достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

1) в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) – использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;

2) в экологии – повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;

3) в энергетике – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсия биомассы в биогаз;

4) в сельском хозяйстве – разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв; в области животноводства – создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;

5) в медицине – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и

специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

В качестве примера на рис. 1 представлены современные направления биотехнологии, предназначенные для создания продовольствия.



Рис. 1. Перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием (Т.А.Егорова и соавт., 2003).

Будущее биотехнологии некоторые исследователи связывают с *протоинженерией* – технологией изменения свойств природных белков на генетическом уровне, получения новых белков (инсектицидов, биостимуляторов, биосенсоров, качественных продуктов питания, лекарств и

др.). Так, например, использование биосенсоров лежит в основе *биоэлектроники*, призванной обеспечивать революционные изменения в методах измерений и контроля в различных областях науки и техники. Основная доля успехов биотехнологии в последние годы связана с развитием методов генной инженерии – технологии рекомбинантных ДНК. Согласно определению Национальных институтов здоровья США, *рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки, в пробирке, путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с векторами, способными самореплицироваться в клетке*. Материалы по генной инженерии изложены в предыдущем издании: Чиркин А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК. Витебск: Издательство УО «ВГУ им. П.М.Машерова», 2004.

Современные методы биотехнологических процессов: методы промышленной микробиологии, генная инженерия, использование иммобилизованных ферментов, клеточных органелл, клеток, тканей растений, насекомых и животных.

Промышленная микробиология базируется на фундаментальных науках микробиология, иммунология и биохимия. В течение последнего столетия промышленная микробиология постепенно занимала передовые позиции в получении пищевых добавок и чистых биологически значимых веществ по сравнению с производствами, основанными на химическом синтезе. Существенным прорывом в развитии промышленной микробиологии явился синтез пенициллина и других антибиотиков. На одной из последних технологических схем синтеза пенициллина представлены типичные этапы биотехнологического процесса синтеза и выделения антибиотика (рис. 2). В промышленной микробиологии важную роль играют знания по энзимологии и генетике микроорганизмов, а также сведения по таксономии микроорганизмов.

Основу генной инженерии составляет встраивание природной или чужеродной ДНК в вектор, который представляет собой бактериальную плазмиду или геном вируса; затем рекомбинантную молекулу ДНК вводят в клетку, где она реплицируется. Клетка, содержащая такую ДНК, размножается, образуя клон трансформированных клеток, способных к экспрессии чужеродных генов и образованию специфических белков в больших количествах.

Технология иммобилизованных ферментов получила свое развитие в последние 30-40 лет. Иммобилизованные ферменты на гелевых или пористых носителях оказались высокотехнологичными при промышленном ферментативном выделении или синтезе различных химических веществ, включая пищевые продукты (получение концентрата фруктозы из крахмала, этанола и др.).

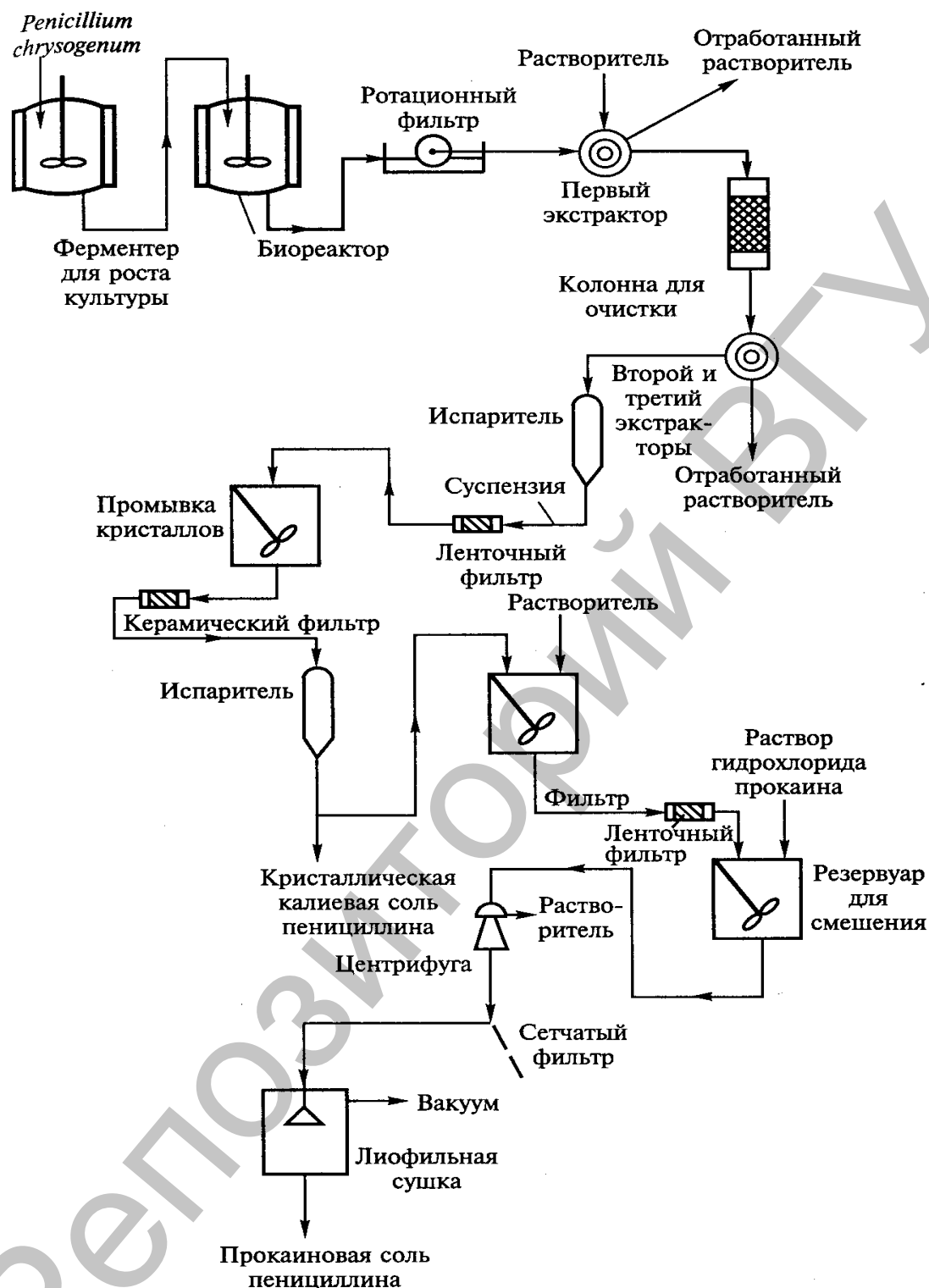


Рис. 2. Технологическая схема производства пенициллина (Т.А.Егорова и соавт., 2003).

В молекулярной биотехнологии определенное место занимает использование клеток животных, например, для культивирования вирусов при производстве вакцин, интерферона, при синтезе моноклональных антител клетками гибридом, получении сложных белков.

Для широкомасштабного производства клонов растений используют меристемы. Культуры растительных клеток применяют для синтеза

различных веществ, чаще всего алкалоидов и других вторичных метаболитов. Начиная с 1970 г. исследователи нередко наблюдали, что клетки, растущие в культуре, синтезируют вещества, которые не обнаруживаются в целом растении.

Весьма перспективным является использование тканей и органов животных, насекомых и растений как *биореакторов*. Наибольший интерес представляет использование молочных желез крупного рогатого скота с целью получения обогащенного специальными добавками молока или лишенного лактозы молока для лиц с дефицитом кишечной лактазы.

Понятие о метаболизме, метаболических путях, карте метаболизма.

Совокупность химических превращений веществ в организме называют метаболизмом. Подавляющее большинство химических реакций в живых клетках катализируется ферментами. Вещества, участвующие в метаболизме, называются метаболитами. Метаболизм выполняет 4 функции: 1) Снабжение организма химической энергией, полученной при расщеплении богатых энергией пищевых веществ или путем преобразования энергии солнца. 2) Превращение пищевых веществ в строительные блоки, которые используются в клетке для биосинтеза макромолекул. 3) Сборка макромолекулярных (биополимеры) и надмолекулярных структур живого организма, пластическое и энергетическое поддержание его структуры. 4) Синтез и разрушение тех биомолекул, которые необходимы для выполнения специфических функций клетки и организма.

По форме усвояемого углерода все живые организмы делятся на 2 группы: 1) Автотрофные клетки ("сами себя питающие") усваивают CO_2 воздуха в процессе фотосинтеза, и из него строят все свои углеродсодержащие биомолекулы (фотосинтезирующие бактерии, зеленые растения). 2) Гетеротрофные клетки ("питающиеся за счет других") получают углерод из сложных органических молекул, например, глюкозы (клетки высших животных и большинства микроорганизмов), т.е. они питаются продуктами жизнедеятельности других клеток. В биосфере автотрофы и гетеротрофы являются участниками кругооборота углерода и кислорода между животным и растительным мирами (рис. 3). По отношению к кислороду гетеротрофов делят: 1) Аэробы - требуют наличия кислорода для окисления питательных веществ. 2) Анаэробы - для окисления питательных веществ кислород не требуется. 3) Факультативные анаэробы - существуют в кислородной и бескислородной средах; 4) Облигатные анаэробы - живут только в бескислородной среде. Большинство гетеротрофов - факультативные анаэробы, которые при наличии кислорода используют аэробные метаболические пути.

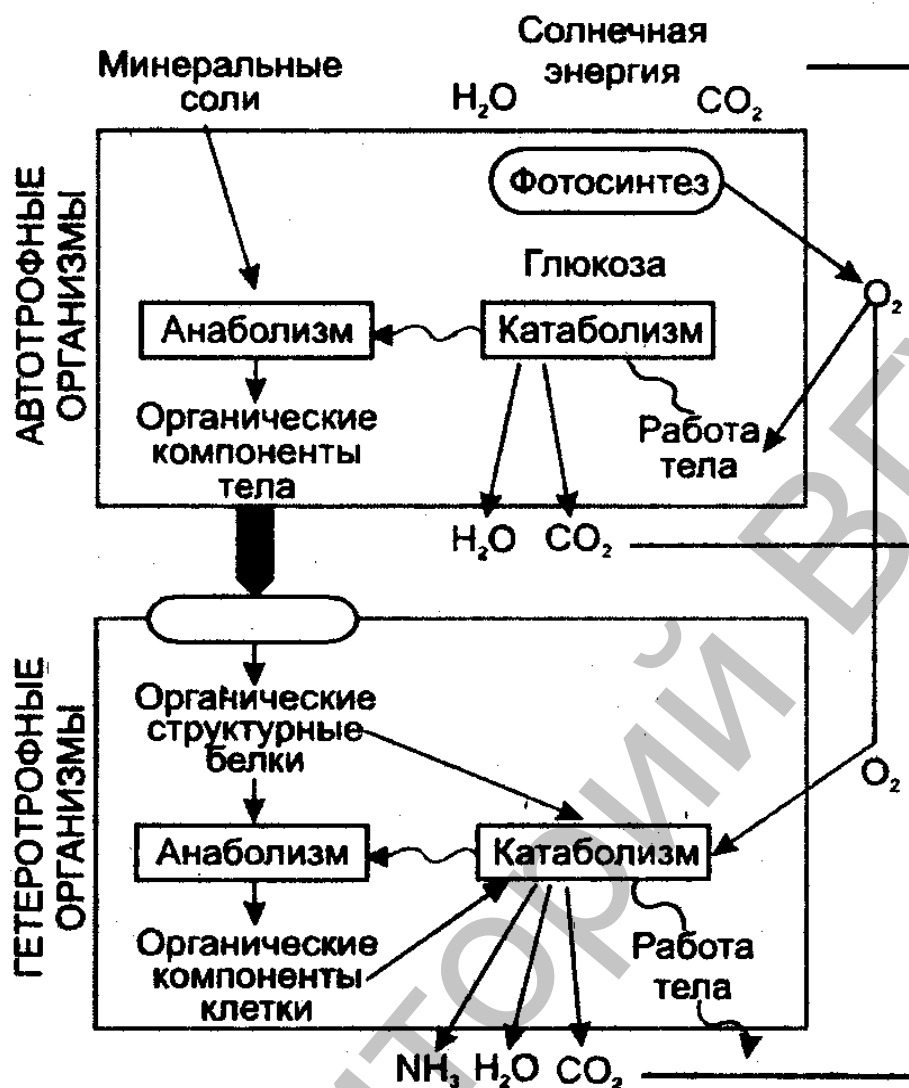


Рис. 3. Катаболизм и анаболизм у автотрофных и гетеротрофных организмов (Голубев В.Н., Жиганов И.Н., 2001).

Метаболические пути. В живой клетке многие тысячи метаболитов вступают в химические реакции. Реакционная способность метаболитов зависит от ряда условий и прежде всего, наличия соответствующих ферментов. Так, например, в мышечных клетках вся глюкоза реагирует только с АТФ и превращается в глюкозо-6-фосфат. Другие реакции не идут, т.к. нет ферментов, а некатализируемые реакции крайне медленны. Образовавшийся глюкозо-6-фосфат является заряженным веществом и поэтому не может покинуть клетку. Дальнейшие превращения глюкозо-6-фосфата определяются набором ферментов, катализирующих последовательные реакции. Т.о. получается ферментативная цепь реакций. Это и есть метаболический путь. Метаболические пути всех веществ связаны друг с другом общими метаболитами и образуют единую сетку реакций - карту метаболизма.

Ферменты и метаболизм. Понятие о регуляции метаболизма. Метаболизм регулируется за счет ферментов. Регуляция активности и

количества ферментов лежит в основе метаболических процессов в норме и при патологии. Еще в прошлом веке Клодом Бернаром было установлено, что внутриклеточные константы сохраняются, невзирая на изменение окружающей среды. Это концепция гомеостаза в своей основе содержит координированную деятельность многих ферментативных реакций. Для идеализированной клетки используют камерную модель метаболизма. Исследователь судит о метаболизме, изучая входные и выходные параметры. Изучение самих метаболических путей затруднено. Здесь необходимы специальные приемы, например, изотопная техника. Регуляция метаболических путей осуществляется по Ленинджеру на трех уровнях: 1) Быстрое реагирование, связанное с действием аллостерических ферментов, каталитическая активность которых может меняться под влиянием особых веществ, оказывающих стимулирующее или тормозящее действие (эффекторы, модуляторы). 2) У высших организмов - гормональная регуляция, точнее - нейрогормональная регуляция. Это регуляция посредством дистантных гуморальных сигналов, действующих через мембраны, химическую модификацию или геном клетки. 3) Регуляция метаболизма (долговременная) связана с изменением концентрации данного фермента в клетке. Концентрация всякого фермента в любой данный момент определяется соотношением скоростей его синтеза и распада (индукция синтеза, например, диетой).

Катаболизм и анаболизм. Основные конечные продукты метаболизма. В наиболее употребительном значении термин "метаболизм" равнозначен "обмену веществ". В точном смысле "метаболизм" означает промежуточный обмен, т.е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов. Метаболизм складывается из двух фаз - катаболизма и анаболизма.

Катаболизм - это ферментативное расщепление крупных пищевых или депонированных молекул до более мелких с выделением энергии и запасанием ее в виде макроэргических соединений. Катаболизм идет в 3 стадии. Первая стадия - полимеры превращаются в мономеры (крахмал и гликоген - в глюкозу, белки - в аминокислоты, триацилглицерины - в жирные кислоты и др.). Вторая стадия (специфические пути катаболизма) - мономеры превращаются в общие продукты, чаще всего, ацетил-КоА. Третья стадия (общий путь катаболизма) - окисление ацетил-КоА до CO_2 и H_2O в реакциях цикла трикарбоновых кислот. Окислительные реакции общего пути катаболизма (ЦТК) сопряжены с цепями переноса электронов (рис. 4). При этом энергия (~ 40%) запасается в макроэргических связях АТФ (НАДФН).

Анаболизм - ферментативный синтез крупных полимерных молекул из простых предшественников с затратой энергии. Идет в 3 стадии, причем третья стадия катаболизма является первой стадией анаболизма.

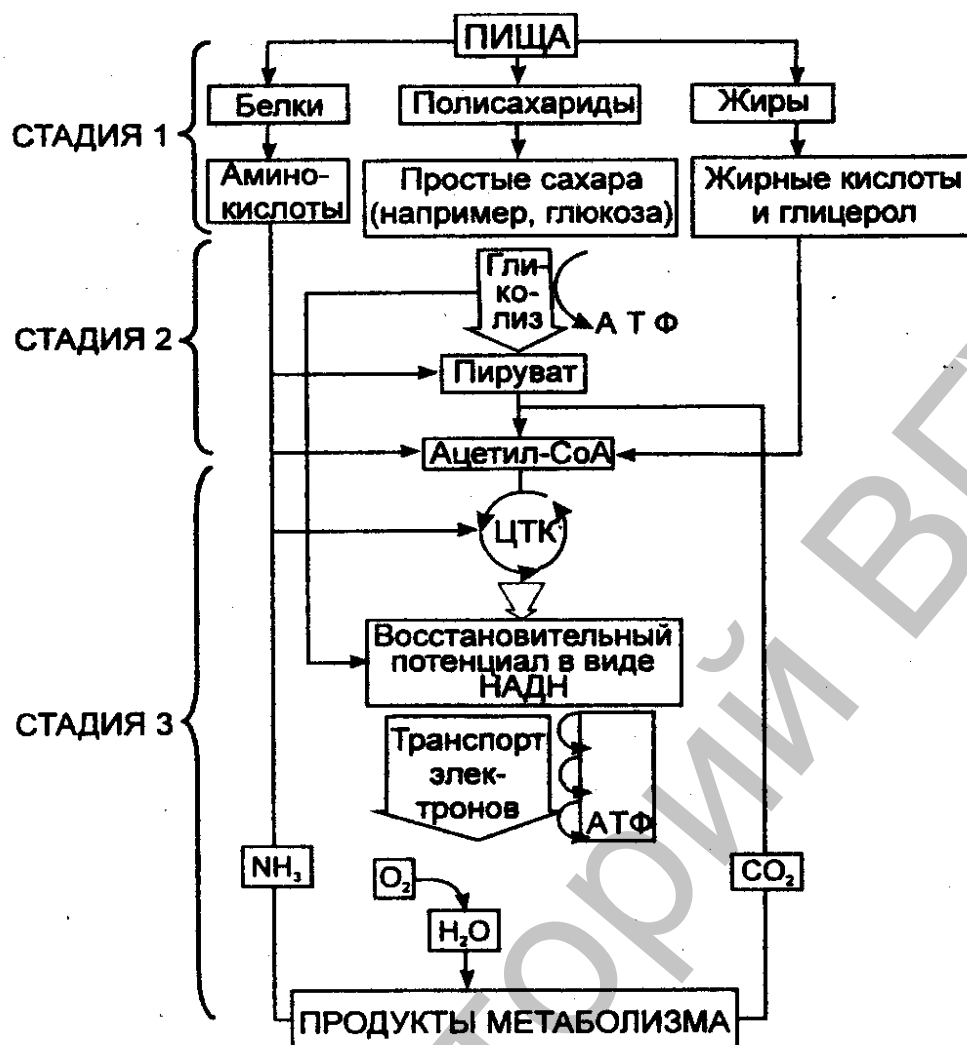


Рис. 4. Схема катаболизма.

Анаболизм и катаболизм не являются простым обращением реакций. Анаболические пути должны отличаться от путей катаболизма хотя бы одной из ферментативных реакций, чтобы регулироваться независимо. Например, специфический путь распада глюкозы до лактата (гликолиз) включает 11 реакций; синтез глюкозы из лактата включает 8 обратимых реакций распада глюкозы и 3 дополнительных реакции с новым набором ферментов. Именно на этих стадиях за счет регуляции активности ферментов регулируются суммарные скорости распада и синтеза глюкозы. Кроме того реакции катаболизма и анаболизма часто разделены мембранами и протекают в разных отсеках (компартаментах) клеток. Например, распад жирных кислот идет в митохондриях, а их синтез в цитозоле. Конечные продукты метаболизма: H_2O , CO_2 , NH_3 .

Особенности метаболизма микроорганизмов представлены на рис.5.

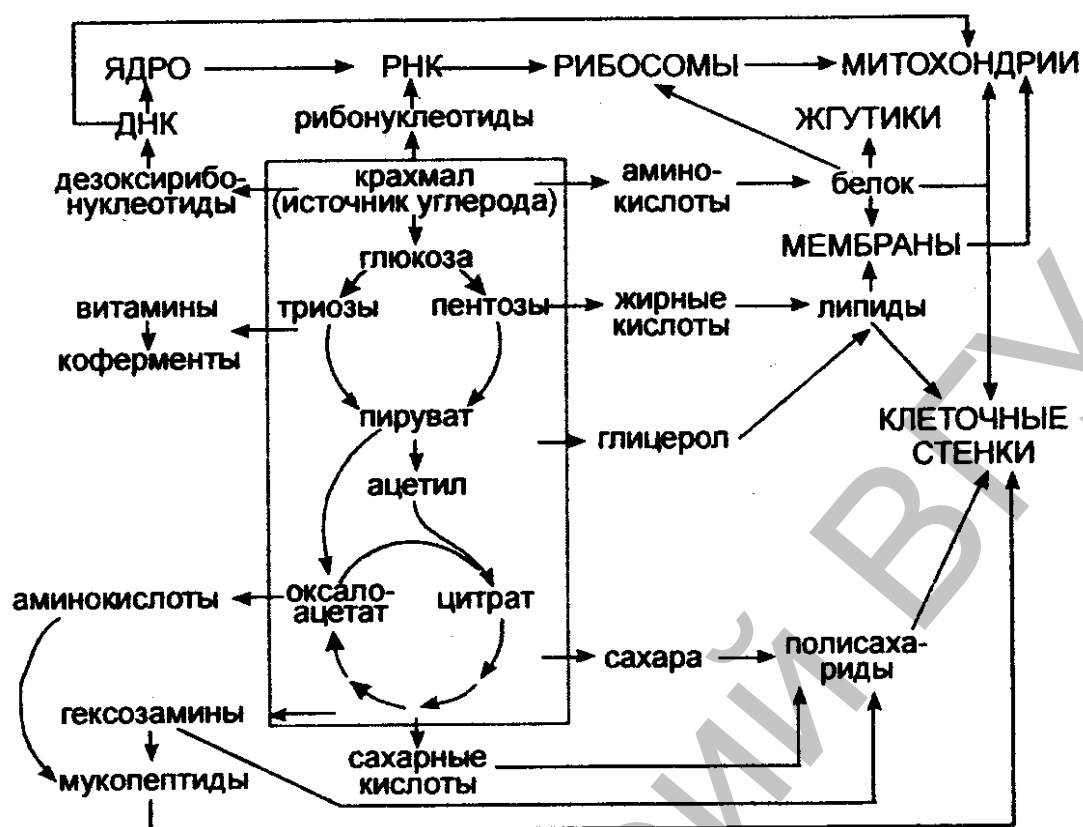


Рис. 5. Основные этапы метаболизма микроорганизмов (Голубев В.Н., Жиганов И.Н., 2001).

Большинство микроорганизмов и зеленые растения способны синтезировать все протеиногенные аминокислоты. Клетки животных не могут синтезировать все аминокислоты, в связи с чем для жизнедеятельности необходимо поступление незаменимых (не синтезируемых) аминокислот с пищей.

Исходным материалом для синтеза аминокислот микроорганизмами служат простые метаболиты (пируват, 2-оксoglутарат, оксалацетат, фумарат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат, АТФ). При синтезе большинства аминокислот аминогруппа вводится только на последнем этапе путем трансаминирования. Другие аминокислоты образуются в результате превращений других аминокислот (рис. 6). Синтезированные аминокислоты используются в процессе трансляции, т.е. синтеза белков на рибосомах с использованием генетического кода иРНК. Эти процессы лежат в основе первых успехов технологии рекомбинантных ДНК: синтез рекомбинантного инсулина клетками *E.coli* после введения в них гена человеческого инсулина. Синтез белков микроорганизмами, растениями, клетками насекомых, животными клетками является наиболее перспективным и разработанным методом молекулярной биотехнологии.

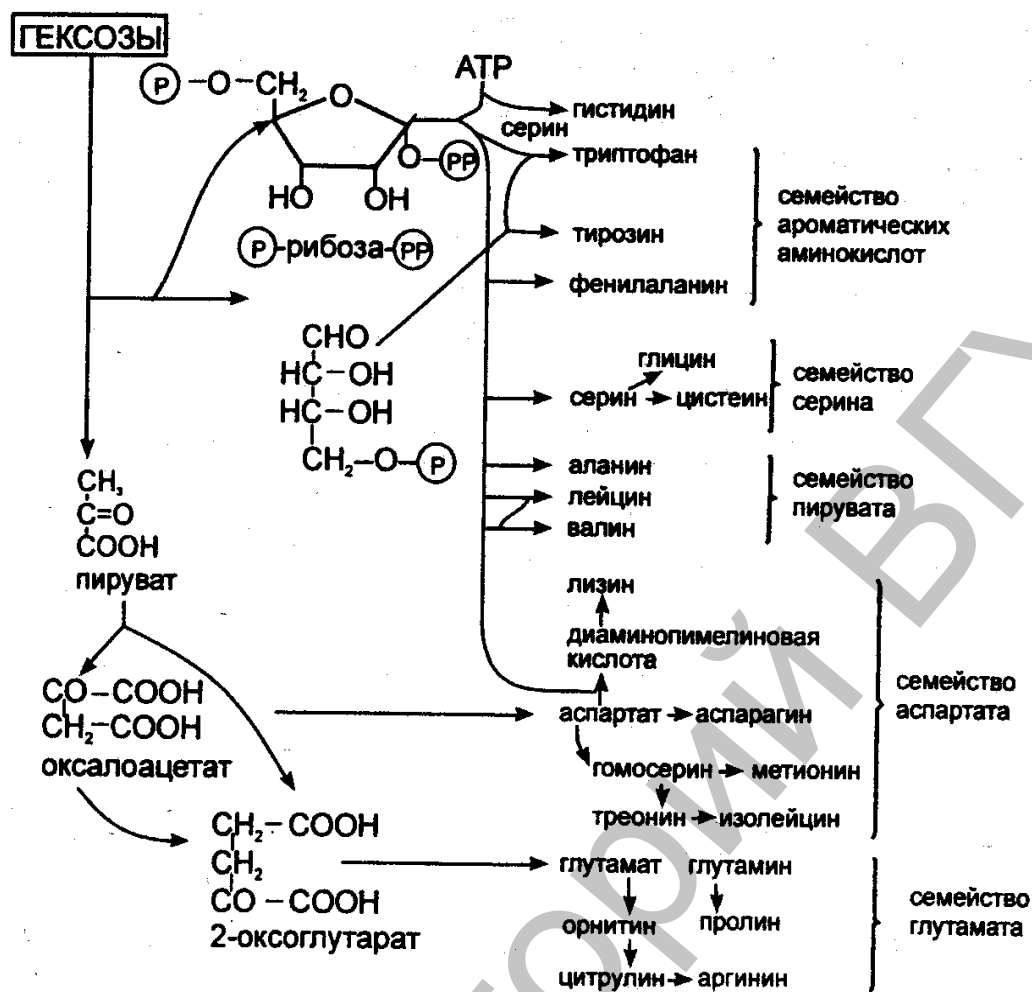


Рис. 6. Биосинтез аминокислот из молекул-предшественников (Голубев В.Н., Жиганов И.Н., 2001)

Продуценты и их селекция. Микроорганизмы, применяемые в микробиологической промышленности, принадлежат разным таксономическим группам (бактерии, аскомицеты, фикомицеты, актиномицеты и др.). Из более чем 100000 известных видов микроорганизмов в промышленности используется около 100 видов, к которым принадлежат несколько тысяч штаммов. Промышленный штамм должен удовлетворять следующим требованиям (по Л.И.Воробьевой, 1987):

- расти на дешевых и доступных субстратах;
- обладать высокой скоростью роста биомассы и иметь высокую продуктивность целевого продукта при экономном потреблении питательного субстрата;
- проявлять направленную биосинтетическую активность при минимальном образовании побочных продуктов;
- быть генетически однородным, стабильным в отношении продуктивности и требований к питательному субстрату и условиям культивирования;
- быть устойчивым к фагам и другой посторонней микрофлоре;

- быть безвредным (не обладать патогенными свойствами) для людей и окружающей среды;

- желательно, чтобы продуценты были термофильными и ацидофильными (или алкалофильными), так как в этом случае легче предохранить ферментируемый субстрат от инвазии посторонней микрофлорой;

- целевой продукт биосинтеза должен иметь экономическую и народнохозяйственную ценность и должен легко выделяться из субстрата.

Большой интерес для производства представляют анаэробные микроорганизмы, поскольку при их культивировании не требуются энергоемкие аэрирующие устройства.

В промышленности применяют три вида штаммов микроорганизмов:

1) природные штаммы, улучшенные естественным и искусственным отбором (производство микробной массы-микробного белка, использование в качестве бактериальных азотистых удобрений, биопестицидов, в производстве пищевых продуктов);

2) штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций;

3) штаммы, полученные методами генетической или клеточной инженерии.

Принципы селекции микроорганизмов. Микроорганизмы, как объект селекции, имеют ряд особенностей (по В.Н.Голубеву, И.Н.Жиганову, 2001):

1. Выращивание микробной культуры из одной клетки – обычный для микробной селекции прием – приводит к тому, что в руках селекционера в качестве исходного материала селекции всегда оказывается особь клона (имеющего генетическую однородность). С другой стороны, клон микроорганизмов быстро достигает такой численности, что за счет естественных мутаций превращается в популяцию клеток с разными генотипами.

2. Большинство микроорганизмов гаплоидны, с одним набором хромосом, поэтому у них нет скрытой изменчивости, являющейся основой селекции высших организмов.

3. У большинства микроорганизмов, имеющих промышленное значение, до сих пор не известна способность к гибридизации (половому размножению). Это означает, что селекцию клеток можно вести только вегетативным путем.

4. Микроорганизмы характеризуются исключительно быстрой сменой поколений, поэтому возможностей для отбора положительных экземпляров у селекционера-микробиолога значительно больше. Оценку выбранного микроорганизма можно провести за считанные дни выращивания (в отличие от макроорганизмов, где результаты селекционной работы видны лишь через несколько лет).

5. Селекционер микроорганизмов имеет огромное число индивидуумов для отбора, что принципиально расширяет его возможности. Но оценка продуктивности каждого клона из сотен и тысяч образцов требует такой трудоемкой работы, часто с применением ряда химических и биохимических

исследований, которая вполне соизмерима с масштабами работы селекционера высших организмов.

Общая схема селекции микроорганизмов включает этапы:

1. Выбор объекта селекции.
2. Мутагенез или рекомбинация генов.
3. Отбор (естественный или искусственный).
4. Стабилизация свойств штаммов, полученных в результате селекции.
5. Консервирование различными способами.

Биотехнологическое сырье. В микробиологической промышленности использование сырья распределяется следующим образом:

- более 90% идет на производство этанола;
- 5% используется при производстве хлебопекарской продукции;
- 1,7% используется при производстве антибиотиков;
- 1,65% идет на производство аминокислот и других органических кислот.

В биотехнологических процессах 40-65% расходов приходится на сырье.

В принципе, микроорганизмы способны ассимилировать любое органическое соединение. Поэтому потенциальными ресурсами для микробиологической биотехнологии могут служить все мировые запасы органических веществ, включая первичные и вторичные продукты фотосинтеза, а также запасы органических веществ в недрах земли. Каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам. В связи с этим органическое сырье (кроме лактозы, сахарозы и крахмала) без предварительной химической обработки практически не пригодно для микробного синтеза. Целлюлозосодержащее сырье после химического или ферментативного гидролиза и очистки от ингибирующих или балластных примесей (фенол, фурфурол, оксифурфурол и др.) может быть использовано в биотехнологическом производстве. Каменный уголь, природный газ и древесина могут служить сырьем для химического синтеза технических спиртов или уксусной кислоты. Последние, в свою очередь, являются отличным сырьем для микробиологической промышленности.

Традиционные источники углерода – кристаллическая глюкоза, техническая сахароза, техническая лактоза, гидрол (сиропообразная жидкость, содержащая глюкозу), крахмал, уксусная кислота, спирт этиловый синтетический, узкая фракция жидкого парафина. Низкомолекулярные спирты (метанол, этанол) можно отнести к числу перспективных видов микробиологического сырья, так как их ресурсы существенно увеличиваются благодаря успешному развитию технологии химического синтеза. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* и др., некоторые виды бактерий (род *Protaminobacter*, *Flavobacterium* и др.) используют в качестве единственного источника углерода метанол и образуют биомассу с высоким содержанием белков (60-70%). В 1939 году В.О.Тоусоном была установлена способность

разных видов микроорганизмов использовать в качестве единственного источника углерода и энергии н-алканы и некоторые фракции нефти.

Побочные продукты производства – высокомолекулярные парафины (ранее сжигались), вода после замачивания кукурузных зерен при выделении крахмала (раннее спускалась в канализацию, теперь упаривают), отходы химического производства (смеси карбоновых кислот, сульфитный щелок, зерновая и картофельная барда, меласса, соапсток, гидрол и др.) нашли применение в микробиологической промышленности как источники углерода. Так, для производства кормовых дрожжей используют сульфитный щелок, картофельную барду, зерновую барду, гидрол, солодовое сусло, молочную сыворотку, депротеинизированный сок растений, гидролизат древесных отходов и торфа. Побочные продукты производства являются сырьевым резервом для микробиологической промышленности. В нашей стране ежегодно остается неиспользованной около 1 млн. т лактозы, содержащейся в сыворотке и пахте. В США из 15 млн. т молочной сыворотки, ежегодно расходуемой на производство сыра, половина теряется со сточными водами, хотя известно, что из одной тонны сыворотки можно получить около 20 кг воздушно-сухой биомассы дрожжей. В микробиологической промышленности нашли широкое применение побочные продукты производства глюкозы из крахмала – меласса и гидрол. В мелассе содержится до 45% сахарозы, все незаменимые аминокислоты кроме триптофана, витамины и витаминоподобные вещества (биотин, пантотеновая кислота, инозит).

Источники минерального питания – неорганические и органические соли. При выращивании биомассы в концентрации 30-40 г/л потребность в добавках азотсодержащих солей обычно не превышает 0,3-0,4% от объема среды. Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли; некоторые виды дрожжей испытывают потребность в нитратах. Часто источником азота в состав сред включают мочевины. При направленном биосинтезе, например, целлюлозолитических ферментов грибом *Peniophora gigantea* наивысшая биохимическая активность клеток наблюдается на средах с органическим азотом (аспарагин, пептон и др.). Микроорганизмы для построения своих компонентов и обеспечения энергетики требуют поступления фосфора, магния, кальция, железа и других элементов (10^{-3} - 10^{-4} М. Повышенная потребность микроорганизмов в микроэлементах возникает, если целевой метаболит содержит микроэлемент. Например, при биосинтезе витамина B₁₂ в питательную среду включают кобальт. Избыточное введение некоторых ионов может изменить потенциал клеток (отрицательный в норме, 16-20 мВ), что нарушит их биологические и продуцентные свойства.

Комплексные обогатители сред необходимы для оптимизации роста и функционирования микроорганизмов: кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат, экстракт, гидролизат, клеточный сок картофельных клубней, молочная сыворотка, экстракт пшеничных отрубей, экстракт солодовых проростков и др. Иногда добавляют мясной и рыбный пептоны. Для культивирования животных клеток используют экстракт плаценты, плазму

крови животных. Для выращивания клеток растений или мицелия высших грибов применяют экстракты тыквы, листьев хлопчатника, отвар слив и др. Все эти добавки приносят витамины, аминокислоты, цитокинины и другие необходимые для роста биологически активные вещества.

Пеногасители и флокулянты. Процессы пенообразования и пеногашения необходимо регулировать при аэробном глубинном культивировании микроорганизмов. Для создания устойчивых режимов пенообразования применяют механические и химические пеногасители и их комбинации. Химические пеногасители (поверхностно-активные вещества – ПАВ) делятся на жировые и синтетические. Жиры проявляют пеногасящие свойства в относительно высоких концентрациях 0,2-1,0% от объема среды. Но их концентрация может изменяться из-за потребления микроорганизмами, а продукты их распада – жирные кислоты – могут закислять среду (нагрузка на буферную систему среды инкубации). Для пищевой промышленности выпускаются эффективные синтетические пеногасители: силиконы, пропинолы, контрамин, полиформаль и др. Для флокуляции (конгломеризации) клеток применяют химические флокулянты (хлорид кальция, соли фосфорной кислоты) или синтетические полиэлектролиты – катион-, анионоактивные, неионогенные. Эффективность применения флокулянтов зависит от температуры культивирования, pH среды и физиологического состояния клеток.

Вода и кислород. Для биосинтеза 1 кг дрожжевой биомассы необходимо 1,0-2,5 кг кислорода. При интенсивном потреблении субстрата продуцент ассимилирует независимо от источника углерода 1,0-4,0 мг кислорода на 1 л среды в минуту. Растворимость кислорода относительно низкая и зависит от условий культивирования клеток. При давлении 0,1 МПа (1 кгс/см^2) и температуре 30 °С в 1 л дистиллированной воды растворяется 7,5 мг кислорода. В реальной питательной среде растворимость кислорода составляет 2-5 мг/л. Запасов кислорода в среде культивирования хватает для обеспечения жизнедеятельности аэробных продуцентов в течение всего лишь 0,5-2 минут. При интенсивном перемешивании и во время интенсивного роста биомассы увеличивается потребление кислорода. Введено понятие о критической концентрации кислорода, при которой лимитируется дыхание клеток: при росте на сахаросодержащих средах критическая концентрация кислорода 0,05-0,1 мг/мл (3-8% от полного насыщения среды кислородом). Оптимальной для роста биомассы считается концентрация кислорода 50-60% от полного насыщения, для биосинтеза целевых метаболитов – 10-20%.

Вода составляет 80-90% биомассы микроорганизмов. Для приготовления питательных сред требуется чистая вода: не более 50 мг/л хлоридов и не более 60 мг/л сульфитов. Концентрации ионов металлов (мг/л) не должны превышать следующих значений: цинк – 5,0, медь – 3,0, фтор – 1,5, свинец – 0,2, мышьяк – 0,05.

Объектами молекулярной биотехнологии являются разнообразные биологические системы:

- микроорганизмы;

- клеточные линии насекомых;
- клеточные линии растений;
- клеточные линии животных;
- многоклеточные организмы (растения, домашние и лабораторные животные).

Во многих случаях генетически модифицированная самовоспроизводящая биологическая единица – микроорганизм, вирус, растение или животное – является конечным коммерческим продуктом. Среди множества биологических объектов, используемых в молекулярной биотехнологии, чаще применяются *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами. Рассмотрим наиболее значимые молекулярно-биотехнологические системы.

Прокариоты и эукариоты. Все живые организмы делят на две группы: прокариоты и эукариоты. Прокариотические клетки (например, бактериальные): 1) хромосомная ДНК находится в цитоплазме, 2) клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан (но не хитин или целлюлоза), 3) в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. Эукариотическая клетка имеет: 1) ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре, 2) клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан, 3) в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, лизосомы, хлоропласты и др.).

*Кишечная палочка (*Escherichia coli*)* – один из наиболее хорошо изученных биотехнологических объектов (генетика, молекулярная биология, биохимия, физиология, общая биология). Это граммотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из почвы и воды. Благодаря способности размножаться простым делением на средах, содержащих ионы натрия, калия, магния, кальция, аммония, хлора, фосфата, сульфата, микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E.coli* стала излюбленным объектом научных исследований. При культивировании *E.coli* на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т.е. время между образованием бактерии и ее делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37 °C составляет примерно 22 мин.

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация белков и разрушение важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клетки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются совсем вследствие структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима,

который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45° до 90 °С и выше), мезофиллы (от 10° до 47 °С) и психрофилы, или психротрофы (от -5° до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, которые применяются в промышленных или лабораторных процессах, а генетически видоизмененные психротрофы используют для биodeградации токсических отходов, содержащихся в почве и воде, при пониженных температурах.

E. coli можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E.coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью культивирования бактерий в лаборатории является синтез и выявление определенного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатируемую комнату и непрерывно встряхивают. Такой аэрации достаточно для размножения клеток, но не всегда – для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются не содержанием в питательной среде источников углерода или азота, а содержанием растворенного кислорода: при 20 °С оно равно примерно девяти миллионным долям. Это становится особенно важно при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белков, конструируют специальные ферментеры и создают системы аэрации.

Широкое применение клеток *E.coli* связано со следующим:

1. Эффект Лурия-Дельбрюка – устойчивость *E.coli* к бактериальным вирусам (бактериофагам) обусловлено именно произошедшими в них мутациями, а не реакцией бактерий на воздействие со стороны бактериофага.
2. Эффект Ледерберга-Татума – между членами генетически неоднородной популяции *E.coli* может происходить обмен генетической информацией (т.е. как и двуполых организмов, в результате физического обмена между хромосомами могут возникать новые генетические комбинации (генетическая рекомбинация). Ледерберг и Татум создали различные штаммы *E.coli*, индуцируя те или иные мутации и отбирая клетки с разнообразными наследуемыми дефектами метаболизма. Например, одна чистая культура могла синтезировать вещества А,В,С, но не D или E (ее обозначили ABCde). Параллельно создали другую чистую культуру, abcDE. Смешав эти культуры, получили бактерии ABCDE. Ни в одной из чистых культур тип ABCDE не возникал спонтанно. Экспериментально исключив остальные возможные причины образования комбинации ABCDE, было

доказано, что она возникает в результате физического обмена генетическим материалом между двумя хромосомами.

Микроорганизмы, используемые в молекулярной биотехнологии, делят на две группы:

1. Микроорганизмы как источники специфических генов (например, ген термостабильной ДНК-полимеразы, используемой в полимеразной цепной реакции).

2. Микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач (например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, которые были генетически модифицированы с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот.

Дрожжи (Saccharomyces cerevisiae) – это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки около 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог *E.coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и *E.coli*. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. В настоящее время ежегодно во всем мире расходуется более 1 млн. тонн *S. cerevisiae*. Эти клетки являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот (например, многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae* аналогичны таковым у человека). Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. В 1996 г. была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae*.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения – во многих случаях это необходимо для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей.

Культуры эукариотических клеток. При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций

исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей.

Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других. В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

Растительные клетки. Большой интерес представляет культура одиночных клеток. Согласно Т.А.Егоровой и соавт. (2003), ее применяют в клеточной селекции для отбора гибридных клеток и их клонирования, а также для генетических и физиологических исследований. Особенно это важно для культивирования растительных клеток. Известно, что одиночная клетка живет, но не делится в тех условиях, которые разработаны для нормального роста и размножения клеток каллусной ткани.

Напомним, что культура изолированных тканей обычно представлена каллусными и гораздо реже опухолевыми тканями. Каллусная ткань образуется в результате повреждения на целых растениях, а также в стерильной культуре на эксплантатах – фрагментах ткани или органа, используемых для получения первичного каллуса. Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (пролиферацией) дедифференцированных клеток. *Дедифференцировка – основа создания каллусной ткани.*

Культивирование одиночных клеток основано на использовании так называемого «кондиционирующего фактора» - метаболитов, выделяемых в среду культивирования делящимися клетками. Действительно, когда в питательную среду вводится одна клетка или небольшое их количество, они не делятся, так как выделяемого «кондиционирующего фактора» не хватает для индукции деления. Следовательно, необходимо повысить концентрацию этого фактора в питательной среде. Это достигается с помощью следующих методов:

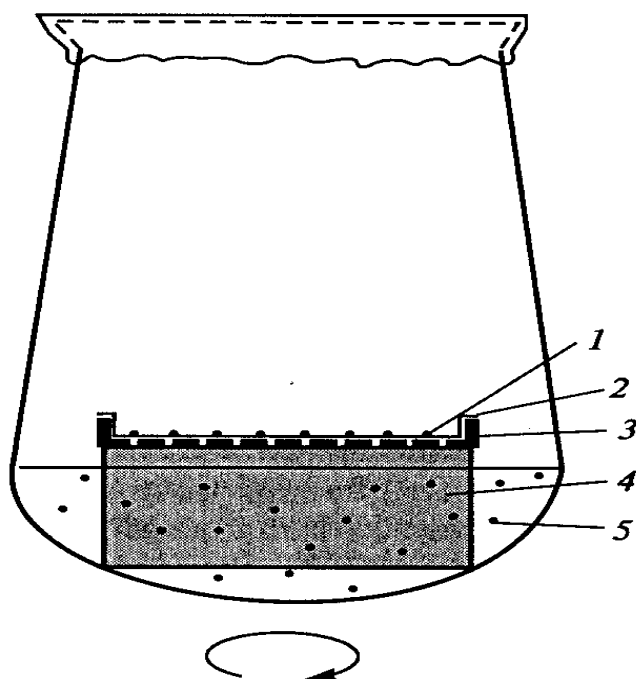


Рис. 7. Использование культуры суспензионных клеток в качестве «кормящего слоя» для выращивания изолированных протопластов и одиночных клеток кукурузы (Егорова Т.А. и соавт., 2003): 1 – колонии клеток; 2 – фильтровальная бумага; 3 – алюминиевая сетка; 4 – пенополиуретан; 5 – суспензия клеток.

1. Метод ткани-«няньки» - кондиционирующий фактор выделяется находящимися рядом с одиночной клеткой кусочками ткани-«няньки».

2. Метод «кормящего слоя» - кондиционирующий фактор выделяют активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка (рисунок 7).

3. Кондиционирование среды – осуществляется путем добавления в нее питательной среды, отфильтрованной от интенсивно делящихся клеток.

4. Метод культивирования одиночных клеток - осуществляется в микрокапле (объем около 20 мкл) богатой питательной среды.

Кондиционирующий фактор водорастворим, термостабилен, не заменяется фитогормонами, включает низкомолекулярные вещества. Химическая природа кондиционирующего фактора видна из следующего эксперимента. Если разделить одиночные клетки и ткань-«няньку» стеклянной пластиной, то деление клеток не наступает. Если вместо пластины поместить целлофан, то хотя и с опозданием начинается деление одиночных клеток (рисунок 8).

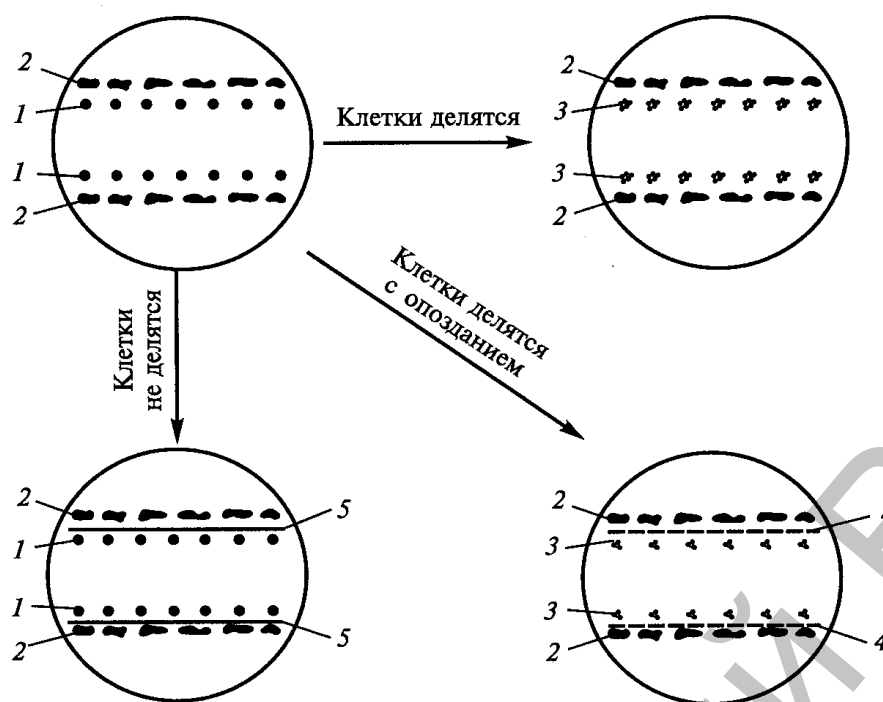


Рис. 8. Доказательство химической природы фактора кондиционирования (Егорова Т.А. и сотр., 2003): 1 – одиночные клетки; 2 – ткань-«нянька»; 3 – делящиеся клетки; 4 – целлофан; 5 – стеклянные пластинки.

Культуры клеток и тканей растений нашли широкое применение в биотехнологии: массовое клональное микроразмножение плодовоовощных и декоративных растений, их оздоровление от вирусных и других инфекций, синтез вторичных метаболитов. Известно около 20000 синтезируемых растениями вторичных метаболитов, используемых человеком: компоненты пищи, лекарства, красители, эфирные масла и др. Способность интактных растений синтезировать различные соединения обосновала предположение о возможности получения таких веществ с помощью культур клеток, тканей и органов. Это направление оказалось весьма перспективным. Синтез вторичных метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток, в регулируемых условиях. Поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают на малых площадях. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. В культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для исходного растения, либо расширяется набор синтезируемых соединений. Важная особенность культивируемой популяции клеток – ее стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вторичного синтеза. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами (таблица 2).

Таблица 2

Внутриклеточная локализация синтеза и накопления вторичных метаболитов (Бутенко Р.Г., 1999)

Внутриклеточные метаболиты	Синтез	Накопление
Алкалоиды	Пластиды, цитоплазма	Вакуоль, хлоропласты, СП
Монотерпены Тритерпены	Лейкопласты Хлоропласты, лейкопласты	СП Вакуоль, СП, цитозоль
Флавоноиды Танины Кумарины Оксикоричные кислоты	Хлоропласты Вакуоль, пластиды Вакуоль, хлоропласты ЭПР, хлоропласты, МХ	Вакуоль, хлоропласты Вакуоль, СП, ЭПР Вакуоль Вакуоль, хлоропласты
Цианогенные гликозиды	ЭПР	Вакуоль
Глюкозинолаты	ЭПР	Вакуоль
Бетаины	Цитозоль	Вакуоль

Примечание: СП – свободное пространство клетки, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, МХ – митохондрии.

Технология рекомбинантных ДНК (молекулярное клонирование или генетическая инженерия) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. Рассмотрим типичную процедуру.

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК). Эту ДНК подвергают ферментативному гидролизу и соединяют с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы. Образуется новая рекомбинантная молекула: конструкция «клонлирующий вектор – встроенная ДНК».

2. Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается по наследству при каждом делении. Этот процесс называется трансформацией.

3. Отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).

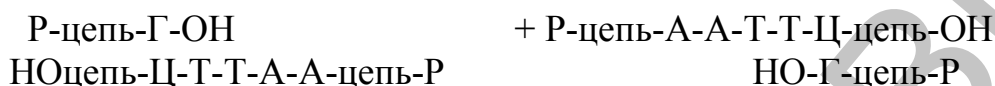
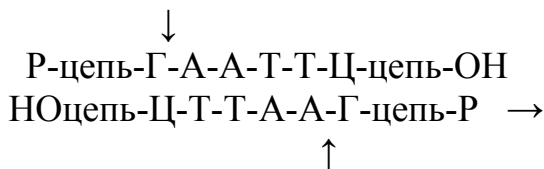
4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Успех молекулярного клонирования зависит:

- 1) от возможности воспроизводимо разрезать молекулу ДНК на фрагменты определенного размера;
- 2) способа их целенаправленного транспорта;
- 3) высокоспецифичного отбора клеток с клонированным геном и возможности индукции его экспрессии.

Для точного разрезания молекул ДНК используют высокоспецифичные ферменты *рестриктазы* - бактериальные рестрицирующие эндонуклеазы

типа II. Например, одна из первых рестрицирующих эндонуклеаз II типа была выделена из бактерии *Escherichia coli* и получила название *EcoRI*. Этот фермент узнает участок ДНК, содержащий специфическую палиндромную последовательность (перевертыш типа «кок», «шалаш») G-A-A-T-T-C, и катализирует разрыв между остатками гуанина (G) и аденина (A) в каждой цепи.



Происходит расщепление связи между атомом кислорода при 3'-атоме углерода дезоксирибозного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5'-углеродному атому дезоксирибозы соседнего нуклеотида. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом (липкие концы). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена. К настоящему времени получены сотни рестриктаз; их номенклатура: род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид – двумя строчными, штамм обычно не указывается; римские цифры – порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма (см. выше *EcoRI*). Палиндромные последовательности, которые атакуют рестриктазы называют сайтами узнавания. Рестриктазы существуют двух типов: 1) катализируют косое расщепление двойной спирали ДНК с образованием «липких концов» и 2) катализируют перпендикулярный разрыв с образованием «тупых концов».

Приведем примеры наиболее часто используемых ферментов рестрикции (таблица 3).

Таблица 3

Нуклеотидные последовательности, распознаваемые типичными ферментами рестрикции (по Б.Глик и Дж. Пастернак 2002)

Фермент	Сайт узнавания	Место разрыва	Характер концов
<i>EcoRI</i>	GAATTC	Г-А	Выступающие концы
<i>BamHI</i>	GGATCC	Г-Г	Выступающие концы
<i>PstI</i>	CTGCAG	А-Г	Выступающие концы
<i>Sau3AI</i>	GATC	Х-Г	Выступающие концы
<i>PvuII</i>	CAGCTG	Г-Ц	Тупые концы
<i>HpaI</i>	GTTAAC	Т-А	Тупые концы
<i>HaeIII</i>	GGCC	Г-Ц	Тупые концы
<i>NotI</i>	GCTGCGC	Г-Ц	Выступающие концы

Рестриктазы используют для 1) изучения последовательности нуклеотидов в ДНК и 2) в генетической инженерии. В последнем случае

рекомбинантные ДНК получают, когда два разных образца ДНК обрабатывают одной и той же рестриктазой с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы. Благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов ДНК могут образовываться новые комбинации генов.

Этот ключевой механизм молекулярного клонирования поддерживается тремя способами:

1. Фрагменты ДНК, образующие комплементарные дуплексы в области липких концов удерживаются водородными связями недостаточно прочно, чтобы молекулы в растворе оставались стабильными длительное время. Для стабилизации используют фермент ДНК-лигаза бактериофага Т4, который катализирует образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые уже удерживаются вместе благодаря спариванию липких концов. Этот же фермент способен «сшивать» тупые концы, которые сближаются друг с другом после связывания с ферментом.

2. Объединение разных молекул ДНК (образование рекомбинантных ДНК) требует их реплицирования в клетке-хозяине. Следовательно, одна часть рекомбинантной молекулы ДНК должна нести нужный ген, который предполагается клонировать, а другая – должна содержать информацию, необходимую для репликации в клетке рекомбинантной ДНК (клонировующие векторы).

3. При рестрикции ДНК образуется смесь разнообразных фрагментов, а затем после их лигирования с векторной ДНК образуется множество различных комбинаций. Поэтому существуют специальные системы скрининга для распознавания реципиентных клеток, содержащих ДНК с нужной для клонирования нуклеотидной последовательностью.

Для целенаправленного транспорта выделенного гена в клетку используют *плазмидные векторы*. Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, содержащие от 1 до 500 т.п.н. Плазмиды встречаются практически у всех бактерий. Их делят на высококопийные (в клетке 10-100 копий) и низкокопийные (в клетке 1-4 копии). На долю плазмидной ДНК приходится 0,1-5,0% суммарной клеточной ДНК. Классификация плазмид по типу содержащейся информации:

- F-плазмиды содержат информацию для собственного переноса из одной клетки в другую;
- R-плазмиды несут гены устойчивости к антибиотикам;
- плазмиды деградации содержат гены, ответственные за утилизацию необычных метаболитов;
- криптические плазмиды несут гены, выполняющие скрытые (латентные) функции;
- плазмиды с узким спектром хозяев несут специфический сайт начала (инициации) репликации и могут реплицироваться только в клетках одного вида;
- плазмиды с широким спектром хозяев – содержат неспецифичный сайт инициации репликации, что позволяет им реплицироваться в разных бактериальных клетках.

Для целей генетической инженерии требуются плазмиды, обладающие тремя важными свойствами:

- 1) небольшой размер (менее 15 т.п.н.) необходимый для эффективного переноса;
- 2) наличие уникального сайта рестрикции, в который может быть осуществлена вставка;
- 3) наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Природные (не модифицированные) плазмиды обычно лишены одного или нескольких свойств, необходимых для эффективного переноса, поэтому качественные плазмидные векторы приходится также создавать методами генетической инженерии.

В технологии рекомбинантных ДНК классическим является плазмидный вектор pBR322. Номенклатура: p – от английского plasmid, следующие буквы имеют отношение к описанию вектора или истории его создания (для данного вектора буквы BR указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса); цифра 322 номер из исследовательского протокола. Размер плазмиды pBR322 4361 п.н. Эта плазида имеет:

- два гена устойчивости к антибиотикам ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r);
- уникальные сайты узнавания ферментами рестрикции для *Bam*H1, *Hind*III, *Sal*I в гене *Tet*^r, один *Pst*I-сайт в гене *Amp*^r (разрыв генов *Tet*^r и *Amp*^r и встраивание в это место клонируемого гена лишит трансформированную плазмидой клетку устойчивости к соответствующему поврежденному гену антибиотика – тетрациклину или ампициллину);
- один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующих последовательностей;
- сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в бактериальных клетках кишечной палочки.

Принцип работы плазмидного вектора pBR322:

1. Плазмиду pBR322 обрабатывают рестриктазой, которая катализирует ее разрыв в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или иному антибиотику. Образуется линейная молекула с липкими концами.
2. Донорную ДНК, содержащую нужный ген, обрабатывают той же рестриктазой, что приводит к образованию фрагментов ДНК с липкими концами.
3. Линейные молекулы плазмиды pBR322 смешивают с обработанной донорной ДНК. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул.
4. Для стабилизации гибридных молекул ДНК производят обработку ДНК-лигазой фага Т4 в присутствии АТФ. В результате этого образуется множество разных комбинаций фрагментов. Кроме того, образуются нежелательные продукты, объединяющие между собой фрагменты донорной ДНК и исходные плазмидные ДНК. Для их уменьшения обрабатывают рестрицированную плазмидную

ДНК щелочной фосфатазой, отщепляющей от линейной молекулы 5'-фосфатные группы. В результате ДНК-лигаза не сможет сшить концы дефосфорилированной линейной плазмидной ДНК. Что касается собственно рекомбинантных молекул ДНК, то два из четырех одноцепочечных разрыва при действии ДНК-лигазы устраняются, и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфодиэфирным связям.

5. После введения гибридной ДНК в клетку хозяина происходит ее репликация и образуются новые кольцевые молекулы уже без разрывов.

Трансформация и отбор. Введение рекомбинантной ДНК в клетку хозяина называется трансформацией. Для ее осуществления используют специально разработанные приемы, например, подвергают клетки высокотемпературному воздействию и обрабатывают их хлоридом кальция. Однако эффективность трансформации остается низкой. *Положительный результат получается примерно в одной клетке из тысячи* (введение в клетку плазмиды со встроенным фрагментом чужеродной ДНК – гибридная плазида). Однако проникновение в клетку экзогенной ДНК еще не означает, что она будет поддерживаться в клетке-хозяине. Для сохранения рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине в первоначальном виде необходимо отсутствие генов, кодирующих синтез эндогенных рестриктаз, разрушающих ДНК. Необходимо также, чтобы клетка имела фенотип RecA^- (такие клетки неспособны к общей рекомбинации).

Следующий этап – это идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК. При использовании плазмиды pBR322, в которой чужеродная ДНК встраивается в сайт *Bam*HI, специфическая идентификация состоит из двух этапов:

1. Клетки после трансформации высевают на питательную среду, содержащую ампицилин. Вырастают только клетки с наличием интактного гена *Amp^r* (или в составе интактной плазмиды pBR322, или в составе гибридной плазмиды). Нетрансформированные клетки чувствительны к ампициллину. Сайт *Bam*HI расположен в гене *Tet^r* плазмиды pBR322; встраивание в этот ген фрагмента ДНК прерывает кодирующую последовательность, в результате чего устойчивость к тетрациклину утрачивается. Следовательно, *клетки, которые несут гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину, а клетки, получившие интактную плазмиду pBR322, несут ген Tet^r и устойчивы как к ампициллину, так и к тетрациклину.*

2. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином. Клетки, образующие колонии на чашках с тетрациклином, содержат интактную плазмиду pBR322 (они устойчивы к обоим антибиотикам). Клетки, не выросшие на среде с тетрациклином, чувствительны к этому антибиотику, а значит они содержат гибридную плазмиду pBR322. Среди колоний, выросших на среде с ампициллином, выделяют те, которые оказались чувствительны к тетрациклину, и из каждой колонии получают индивидуальные клеточные клоны. Чаще объединяют все колонии, устойчивые к ампициллину и чувствительные к тетрациклину, культивируют их вместе. Далее проводят дополнительный скрининг и

идентифицируют те клетки, которые несут гибридную плазмиду pBR322 со специфической вставкой.

В настоящее время известно много плазмидных векторов. Например, на основе плазмиды pUC создан вектор, содержащий ген, который кодирует убивающий клетку белок. Этот остроумный подход позволяет облегчить сортировку и выделение трансформированных клеток.

Итак, системы клонирования должны включать 1) несколько сайтов для специфической рестрикции; 2) удачную структуру вектора, транспортирующего клонируемый ген; 3) достаточно простую идентификацию клеток с рекомбинантными ДНК. Уникальные сайты рестрикции выполняют в опытах с рекомбинантной ДНК двойную функцию: 1) обеспечивают встраивание чужеродной ДНК в вектор; 2) обеспечивают вырезание клонированной последовательности из вектора. Для рутинных процедур молекулярного клонирования используют *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*. Во многих случаях в векторы, которые функционируют в *E.coli*, можно встроить второй сайт инициации репликации, обеспечивающий их репликацию в других клетках. Это так называемые челночные векторы позволяют сначала проводить клонирование в *E.coli*, а затем внедрять готовую конструкцию в другие клетки.

Геномная библиотека. Процесс разделения геномной ДНК на клонируемые элементы и введение этих элементов в клетки-хозяева называется созданием геномной библиотеки (банка клонов, банка генов).

Для молекулярной биотехнологии важна идентификация структурных генов, кодирующих определенные белки. У прокариот структурные гены непрерывны, а у эукариот кодирующие участки генов – экзоны разделены некодирующими – интронами. Поэтому технологии клонирования генов у прокариот и эукариот имеют различия.

У прокариот нужная последовательность для клонирования (ДНК-мишень) часто не превышает 0,02% от суммарной хромосомной ДНК. Технология клонирования и отбора ДНК-мишени включает: 1) гидролиз суммарной ДНК рестриктазой; 2) каждый из получившихся фрагментов встраивают в вектор; 3) обнаружение специфической клеточной линии (клон), которая несет нужную последовательность; 4) выделение и характеристика этой клеточной линии. У эукариот (прерывистые гены) вначале выделяют мРНК, затем с помощью обратной транскриптазы синтезируют кДНК (ДНК, комплементарная мРНК) и уже ее используют для молекулярного клонирования и создания геномной библиотеки.

Следующий после создания геномной библиотеки этап – это поиск клона (клонов), несущего искомую последовательность ДНК. Для этого используют три метода.

1. Гибридизация с меченым ДНК-зондом с последующим радиоавтографическим анализом. После трансформации высевают клетки на чашки с питательной средой и переносят выросшие колонии на твердую подложку (нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр). Лизируют клетки. Производят депротеинизацию и денатурацию ДНК. Фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченый зонд и производят отжиг, а затем радиоавтографию. Колонии на исходной чашке, которые содержат гибридизовавшуюся ДНК, выделяют и культивируют.

2. Иммунологический скрининг. В результате экспрессии клонированного гена образуется белок, который можно обнаружить иммунологическими методами. Для этого все клеточные линии (клоны) библиотеки высевают на чашки с питательной средой. Выросшие колонии переносят на фильтр, клетки лизируют, а высвободившиеся белки фиксируют на фильтре. Затем на фильтр наносят первые антитела, которые специфически связываются с данным белком (антигеном). Все несвязавшиеся антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор вторых антител, специфичных в отношении первых антител. Во многих тест-системах используют конъюгаты вторых антител с ферментом (например, щелочной фосфатазой). После отмывания фильтра добавляют бесцветный субстрат. Если вторые антитела связываются с первыми, то под действием фермента происходит гидролиз субстрата с образованием окрашенного вещества в том месте, где идет реакция.

3. Скрининг по активности белка. Если искомым ген кодирует фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином, то для обнаружения клонов используют цветную реакцию, катализируемую данным ферментом.

Клонирование крупных фрагментов ДНК. Чтобы иметь возможность клонировать целый ген, донорную ДНК расщепляют лишь частично. При этом получают фрагменты разной длины, из которых затем создают геномную библиотеку. Для клонирования крупных фрагментов ДНК были сконструированы векторы на основе бактериофагов лямбда и P1, а также плазмиды F.

В заключение этого раздела лекции следует отметить, что конечный результат молекулярного клонирования ДНК лишь тогда положителен, если будет доказано получение нативного структурного гена.

Для целей молекулярного клонирования используются химический синтез, определение нуклеотидной последовательности и амплификация ДНК.

Химический синтез ДНК используют для получения 1) одноцепочечных цепей дезоксирибонуклеотидов (олигонуклеотиды) и 2) двухцепочечных цепей ДНК (синтез генов).

Синтез олигонуклеотидов длиной около 50 нуклеотидов осуществляется с помощью ДНК-синтезаторов с использованием фосфорамидитного метода. В отличие от биологического синтеза ДНК (присоединение каждого последующего нуклеотида по 3'-ОН группе дезоксирибозы, в химическом синтезе каждый новый нуклеотид присоединяется к 5'-ОН группе, т.е. 5'-концу олигонуклеотида). Синтезированные олигонуклеотиды используются:

- для конструирования фрагментов или целых генов;
- для амплификации (усиление синтеза) специфических фрагментов ДНК;
- для направленных мутаций изолированных ДНК;
- в качестве зондов при гибридизации (нуклеотидную последовательность зондов длиной 20-40 звеньев находят из данных об аминокислотной последовательности соответствующих белков);
- в качестве линкеров, облегчающих клонирование (линкер – синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции; используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры);

- олигонуклеотиды длиной 17-24 звеньев служат праймерами при секвенировании ДНК и проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Синтез генов из химически синтезированных отдельных комплементарных цепей олигонуклеотидов. Как правило, синтетические двухцепочечные гены собирают из модулей – одноцепочечных фрагментов длиной от 20 до 60 нуклеотидов с перекрывающимися концами. Нуклеотидные последовательности цепей задают так, чтобы после отжига (образование комплементарных двухцепочечных фрагментов) концевые сегменты гена имели тупые концы. Каждый внутренний сегмент имеет выступающие 3'- и 5'-концы, комплементарные таковым соседнего сегмента. После сборки гена остается сшить одноцепочечные разрывы с помощью ДНК-лигазы Т4. Синтетические гены могут быть сконструированы так, чтобы помимо белок-кодирующих последовательностей они содержали концевые участки, обеспечивающие:

- встраивание в клонирующий вектор (сайты для рестриктаз);
- сигнальные последовательности для правильной инициации и терминации транскрипции и трансляции..

Секвенирование ДНК – это определение нуклеотидной последовательности полинуклеотидных цепей. Без знания нуклеотидной последовательности генов невозможно осуществлять молекулярное клонирование. Для секвенирования используют несколько методов.

1. Дидезоксинуклеотидный метод. Дидезоксинуклеотид – это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахара. У дезоксирибонуклеотидов, входящих в ДНК, отсутствует только 2'-гидроксильная группа. Как указано выше, удлинение цепи во время репликации ДНК происходит в результате присоединения очередного нуклеозидтрифосфата к 3'-гидроксильной группе последнего нуклеотида растущей цепи. Если же присоединяемым нуклеотидом является дидезоксинуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфодиэфирную связь. Остановка синтеза ДНК – ключевой этап дидезокси-метода. Для секвенирования в разных пробирках одновременно проводят четыре реакции синтеза ДНК, каждая – в присутствии одного из четырех дидезоксинуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддЦТФ и ддТТФ). Продукты реакций разделяют с помощью гель-электрофореза, проводят радиоавтографию и «считывают» с радиоавтографа нуклеотидную последовательность синтезированного фрагмента ДНК.

2. Для секвенирования более длинных генов используют систему на основе фага M13. В ДНК фага встраивают фрагмент ДНК длиной до 500 нуклеотидов, который хотят секвенировать. Эту рекомбинантную ДНК легко получить в одноцепочечной форме и использовать ее в качестве матрицы для секвенирования вставки. Можно использовать также двухцепочечные плазмиды, содержащие клонированную ДНК.

3. Для определения нуклеотидной последовательности протяженных клонированных сегментов сначала подбирают синтетический олигонуклеотидный праймер, комплементарный участку, соседствующему со вставкой. Затем с помощью дидезокси-метода секвенируют первые 250-300 нуклеотидов. Затем по результатам секвенирования синтезируют второй праймер и определяют последовательность следующих 250-350 нуклеотидов клонированного участка и т.д. Этот метод, называемый «праймер-опосредованной прогулкой» (или «блуждающей затравкой»), позволяет секвенировать протяженные фрагменты ДНК без их субклонирования, как в случае системы на основе фага M13.

В таблице 4 представлен прогресс в секвенировании генов.

Историческая справка о секвенировании ДНК генов (Primrose S.B., Twyman R.M., 2003)

Секвенированный ген	Год	Размер гена	Комментарий
Бактериофаг ϕ x174	1977	5,38 kb	Первый ген
Плазмида <i>pBR322</i>	1979	4,30 kb	Первая плазмида
Бактериофаг A	1982	48,5 kb	
Вирус Эпштейн-Барра	1984	172 kb	
Дрожжевая хромосома III	1992	315 kb	Первая хромосома
<i>Haemophilus influenzae</i>	1995	1,8 Mb	Первый геном организма-клетки
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1996	12 Mb	Первый геном клетки-эукариота
<i>Ceanorhabditis elegans</i>	1998	97 Mb	Первый геном мультিকлеточного организма
<i>Drosophila melanogaster</i>	2000	165 Mb	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2000	125 Mb	Первый геном растения
<i>Homo sapiens</i>	2001	3000 Mb	Первый геном млекопитающего
Pufferfish (<i>Fugu rubripes</i>)	2002	400 Mb	Наименьший геном позвоночных
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	2002/3	2700 Mb	Генетическая модель человека

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей (Kary Mullis; США, патент 4,683,202). Их амплификация (иногда в миллионы раз) осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы:

- два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность-мишень; 3'-гидроксильные группы праймеров после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу (таким образом отмечают начальный и конечный участки нужного фрагмента на ДНК-матрице);

- ДНК-мишень длиной от 100 до 35000 п.н.;
- термостабильная ДНК-полимераза *Taq*, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, которая не теряет своей активности при температуре 95 °C и выше;

- четыре дезоксирибонуклеотида;

- буфер, содержащий ионы магния.

Этапы ПЦР:

1. Денатурация (плавление). Для денатурации ДНК (расхождение цепей) ее выдерживают до 1 мин. При 95 °C. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре дезоксирибонуклеотида.

2. Ренатурация (отжиг). Температуру смеси медленно понижают до 55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. Синтез (элонгация). Температуру повышают до 75 °С, т.е. температурного оптимума для ДНК-полимеразы *Taq*. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемой 3'-гидроксильной группой праймера.

Все реакции проводятся в регулируемом термостате с повторением циклов, продолжительностью 3-5 мин. Эти циклы повторяют до 30 раз.

Применение метода ПЦР:

- Идентификация патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений. Для синтеза праймеров, специфичных в отношении исключительно ДНК-мишени, необходимо знать нуклеотидную последовательность ДНК предполагаемого патогенного микроорганизма. В этом случае в ходе ПЦР будет амплифицироваться только фрагмент ДНК, длина которого равна суммарной длине двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

- Получение кДНК (ДНК, комплементарные информационной РНК, мРНК). Метод называют RACE (rapid amplification of cDNA ends). Обычно получают кДНК, комплементарные 3'- и 5'- концам мРНК (3'RACE и 5'RACE). В случае 3'RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК является олиго(дТ) с присоединенным к нему вторым праймером (Р). Олиго(дТ) спаривается с поли(А)-хвостом мРНК (3'-конец молекулы). С помощью обратной транскриптазы на матрице мРНК синтезируется цепь кДНК. На матрице синтезированной цепи кДНК синтезируется вторая цепь и затем в последовательных циклах ПЦР с введением «внутренних праймеров» накапливаются значимые количества кДНК, комплементарной 3'концу мРНК.

- Синтез генов с помощью ПЦР.

- Выделение делеций или вставок в генах, ответственных за то или иное наследственное заболевание. Например, определение мутаций с помощью аллельспецифических проб производится следующим образом. Синтезируются 2 коротких ³²Р-олигодезоксирибонуклеотида, один из которых содержит ДНК-последовательность, включающую мутацию, а другой не изменен. С помощью этих аллельспецифичных проб ДНК пациентов проверяют на носительство исследуемой мутации. Для этого область гена, содержащую интересующий участок, амплифицируют с помощью ПЦР. Образцы наносят на узкие полоски нитрата целлюлозы и обрабатывают мечеными олигонуклеотидами, содержащими нормальную или мутантную последовательность. Радиоавтографически оценивают, с какой из проб преимущественно связывается ДНК пациента.

Ферменты (энзимы) - биологические катализаторы белковой природы. Происхождение терминов: fermentatio (лат.) - брожение; enzyme (греч.) - в дрожжах. Открытие ферментов было связано с процессами, идущими с выделением газов (тесто, вино), а следовательно, это явление человек

наблюдал и использовал тысячелетия. В настоящее время при помощи ферментов получают фруктозный сироп, L-аминокислоты, лекарства и многие пищевые продукты.

Ферментативный катализ отличается от неорганического:

- 1) Ферменты действуют в мягких условиях организма (P , t° , pH).
- 2) Белки-ферменты чувствительны к денатурирующим агентам.
- 3) Для действия ферментов характерна высокая эффективность.
- 4) Активность ферментов контролируется (генетически на уровне строения и различными биорегуляторами).
- 5) В организме, как правило, действуют полиферментные (т.е. поликаталитические) системы, в результате чего достигается многоэтапное направленное превращение вещества с допустимыми для организма уровнями перепада энергии. Например: в пробирке $H_2 + O_2 \rightarrow H_2O + \text{взрыв}$ (гремучий газ); в организме та же реакция, но за счет разбивания ее на фазы протекает без взрыва, а с запасанием энергии в виде АТФ.
- 6) Для действия ферментов характерна специфичность (четыре вида). а) Абсолютная - фермент катализирует превращение строго определенного вещества (уреаза расщепляет только мочевины на CO_2 и NH_3). б) Относительная - фермент катализирует превращения одного типа связей в ряду близких по химическому строению веществ. Например: липаза катализирует разрыв сложноэфирных связей, независимо от типа радикала. в) Групповая относительная, то же, но для разрыва связи важны образующие ее атомные группировки. Все протеолитические ферменты расщепляют пептидные связи, но пепсин, трипсин, химотрипсин расщепляют пептидные связи, образованные определенными аминокислотами. г) Стереохимическая - фермент катализирует превращение только одного стереоизомера при наличии рацемата (L-оксидазы превращают L-аминокислоты, но не D-аминокислоты).

Строение ферментов. По строению ферменты бывают простыми и сложными белками. Для сложных белков-ферментов используют следующие обозначения: 1) апофермент - полипептидная часть молекулы фермента; 2) холофермент, прочный природный комплекс апофермента и небелковой части; 3) кофактор - небелковая часть сложного белка-фермента; 4) простетическая группа - прочно связанный с апоферментом кофактор (металлы, гем и др.); 4) кофермент - легко отделяемый кофактор от апофермента (например, диализом) (витамины, нуклеотиды и др.) Апофермент всегда синтезируется в организме, кофакторы (витамины, металлы и др.) должны поступать с пищей. Ферментативный катализ идет на поверхности фермента. Превращаемые вещества называются субстратами. Превращение субстрата происходит в области *активного центра*, который сформирован в третичной структуре большинства ферментов. У простых белков-ферментов активный центр образован сближенными в пространстве радикалами аминокислот первичной структуры. У сложных белков-ферментов здесь находятся кофакторы. В активном центре выделяют 2 части: якорная (радикалы аминокислот обеспечивают фиксацию субстрата) и

каталитическая (радикалы аминокислот и (или) кофакторы обеспечивают катализ). Коферменты определяют природу катализируемой реакции. По выполняемым функциям коферменты можно разделить на три группы:

- переносящие ионы водорода или электроны; связаны с окислительно-восстановительными ферментами (НАД, НАДФ, ФАД);
- участвующие в переносе групп атомов (АТФ, КоА, тетрагидрофолат, пиридоксальфосфат);
- катализирующие реакции синтеза, распада и изомеризацию углеродных связей (тиаминпирофосфат, биотин, производные витамина В₁₂).

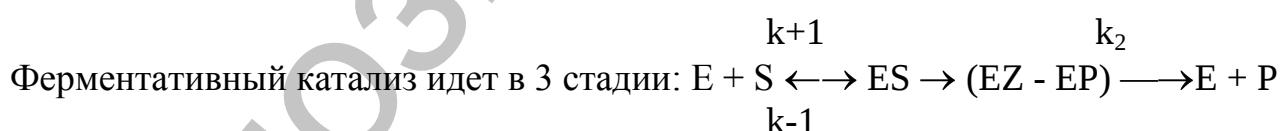
У ряда регуляторных ферментов имеется еще один центр - *аллостерический*. Присоединение к этому центру низкомолекулярных веществ (эффекторов) индуцирует изменение третичной структуры фермента, в том числе и в области активного центра. Это и ведет к изменению каталитической активности фермента.

Белки-ферменты с четвертичной структурой могут катализировать одну и ту же реакцию, но несколько отличаться по строению (т.е. первичной структуре) субъединиц. Если это закреплено генетически - мы говорим об изоферментах. Например, фермент лактатдегидрогеназа состоит из 4-х субъединиц 2-х типов Н и М и возможно 5 вариантов, т.е. изоферментов.

В настоящее время описано более 2000 ферментов. Молекулярная масса ферментов составляет от 150000 до миллиона Да и выше.

Механизмы действия ферментов. 1) По Фишеру: субстрат подходит к ферменту (т.е. активному центру) как ключ к замку. 2) По Кошланду: субстрат изменяет конформацию активного центра фермента, делая ее комплементарной (индуцируемая адаптация фермента к субстрату; рука - перчатка).

1) Образование фермент-субстратного комплекса: $E + S \leftrightarrow ES$ быстрая стадия, соответствующая фиксации субстрата на якорном участке активного



центра. Ускорение реакции достигается за счет сближения и правильной ориентации субстратов относительно друг друга и увеличения их эффективной концентрации (поскольку в растворе их столкновения случайны). 2) $ES \rightarrow EZ \rightarrow EP$ На стадии фермент-субстратного комплекса происходит химическая реакция через переходное состояние с образованием продукта реакции на поверхности фермента. Как правило субстрат вступает во временные промежуточные реакции (взаимодействия) с определенными функциональными группами активного центра, в результате чего реакция требует более низкой энергии активации. 3) $EP \rightarrow E + P$. Продукт отделяется, а фермент в неизменном виде может вновь вступать в катализ.

Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций. 1) Влияние концентрации субстрата. При увеличении концентрации субстрата и при постоянной концентрации фермента скорость реакции вначале

увеличивается линейно (реакция первого порядка), затем переходит в реакцию смешенного порядка и, достигнув $V_{\max}$, превращается в реакцию нулевого порядка.

По Михаэлису-Ментен скорость реакции описывается уравнением:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \xrightarrow{\text{разделить на } [S]} \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}}, \text{ где } K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

(константа диссоциации комплекса ES равна отношению констант скоростей обратной и прямой реакции).
Это уравнение

описывает участок реакции первого порядка. Для описания всей кривой Бриггс и Холдейн модифицировали уравнение: где K_m - константа Михаэлиса: это такая концентрация субстрата, при которой $V = 1/2 V_{\max}$. Величина K_m определяется графически по кривой зависимости V от $[S]$:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

по оси ординат откладывают $V_{\max}/2$, опускают перпендикуляр на кривую и от точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Отмеченный отрезок и есть K_m . Если K_m велика, то это означает, что потребуется много субстрата для достижения $V_{\max}/2$ (сродство фермента к субстрату низкое, медленная скорость реакции). Низкая величина K_m указывает, что для достижения половинной скорости требуется мало субстрата (высокое сродство, высокая скорость реакции). Для точного измерения величин $V_{\max}$ и K_m используют график прямой, построенный на основании модифицированного уравнения Михаэлиса-Ментен (график Лайнуивера и Берка):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

2) Влияние концентрации фермента. При условии избытка субстрата скорость ферментативной реакции зависит от концентрации фермента. Эта зависимость подчиняется уравнению прямой $V = k \cdot [E]$, где $[E]$ - концентрация фермента.

3) Влияние температуры. Скорость химической реакции повышается в 2-4 раза при повышении температуры на 10°C . Однако из-за белковой природы фермента повышение температуры приведет к тепловой денатурации молекул фермента. Поэтому оптимум температуры для ферментов растений при $45-50^\circ\text{C}$, а для ферментов теплокровных $\sim 37^\circ\text{C}$. Есть исключения: миокиназа мышц выдерживает температуру 100°C .

4) Влияние pH среды. Ферменты, подобно всем белковым молекулам несут заряженные группы. Общий заряд белковой молекулы зависит от pH среды. Зависимость скорости ферментативной реакции от величины pH носит колоколообразный характер. Большинство ферментов проявляют максимальную активность в узком диапазоне pH - оптимум pH. Для

большинства ферментов оптимум pH ~ 7.4; однако для пепсина 1-1.5; для трипсина 8.6.

Классификация ферментов. Ранее ферменты назывались по наименованию субстрата с добавлением суффикса - аза (amylon - амилаза, lipos - липаза, protein - протеиназа). Позже, ферменты, катализирующие сходные реакции, получили название по типу реакции: дегидрогеназы, оксидазы, декарбоксилазы и др. Международный Совет Биохимиков (IUB) предложил положить в основу наименования и классификации ферментов тип химической реакции и ее механизм:

1) Реакции и ферменты их катализирующие делят на 6 классов, каждый из которых состоит из 4-13 подклассов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы).

1.1. Оксидоредуктазы. К классу оксидоредуктаз относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов А и В: $A_{\text{восстан.}} + B_{\text{окислен}} \leftrightarrow A_{\text{окислен.}} + B_{\text{восстан.}}$. Систематические названия их составляют по форме "донор: акцептор оксидоредуктазы". Например: ЛГД - лактат: НАД⁺ оксидоредуктаза (тривиальное название лактатдегидрогеназы). Различают следующие основные оксидоредуктазы: оксидазы (аэробные дегидрогеназы), которые катализируют перенос протонов (электронов) на кислород (на атом кислорода); анаэробные дегидрогеназы, катализирующие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород; цитохромы, обеспечивающие перенос только электронов; каталаза и пероксидаза, катализирующие реакции с участием перекиси водорода (перенос протонов и электронов на молекулу кислорода).

1.2. Трансферазы. К классу трансфераз относятся ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса групп Х (отличной от атома водорода) с субстрата А на субстрат В: $A-X + B \leftrightarrow A + B-X$. Катализируют перенос одноуглеродных остатков, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Наименование этих ферментов составляется по форме: "донор: транспортируемая группа - трансфераза". Например, Ацетил-КоА + Холин $\leftrightarrow$ КоА + Ацетил-холин. Эту реакцию катализирует фермент ацетил-КоА: холин-О-ацетилтрансфераза (короче - холин-ацетилтрансфераза).

1.3. Гидролазы катализируют гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозидных связей, кислородных ангидридов, связей С-С, С-галоген и Р-N, т.е. расщепление внутримолекулярных связей с участием воды. Наименование их составляется по форме: "субстрат - гидролаза". Например, Ацетилхолин + H₂O $\leftrightarrow$ Холин + Уксусная кислота. Фермент называется ацетилхолин-ацилгидролаза. К этому классу относят эстеразы (гидролиз и синтез сложных эфиров); гликозидазы (разрыв гликозидных связей); фосфатазы и пептидгидролазы (разрыв фосфоангидридных и пептидных связей) и др.

1.4. Лиазы - это ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому (без участия воды) механизму, с образованием двойных связей.

Ферменты действуют на связи C-C, C-O, C-N, C-S и C-галоген. Название ферментов: "субстрат-лиаза". Например, L-малат $\leftrightarrow$ фумарат + H₂O. Этот фермент называется L-малат-гидролиаза (тривиальное название - фумараза). К этому классу относят декарбоксилазы (карбокси-лиазы, амилазы-лиазы и др.).

1.5. Изомеразы катализируют различные типы оптических, геометрических и позиционных изомеров). Название этих ферментов составляется с учетом типа реакции: "Субстрат-цис-транс-изомераза (например транс-ретиаль - 11-цис-транс-изомераза катализирует превращения транс-ретиала в 11-цис-ретиаль при восприятии света); "альдегид-кетон-изомераза" (D-глицеральдегид-3-фосфаткетон-изомераза катализирует превращение D-глицеральдегид-3-фосфата в дигидроксиацетонфосфат); если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, то фермент получает название мутазы. К классу изомераз относят так же рацемазы и эпимеразы.

1.6. Лигаза катализируют соединения двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или другого макроэргического соединения. Систематическое название этих ферментов составляют по форме "А: В лигазы", где через А и В обозначают исходные вещества. В этот класс включены ферменты, катализирующие реакции образования связей C-O, C-S, C-N, C-C. Например, образование C-N связи при синтезе глутамин катализирует фермент L-глутамат: аммиак лигаза, тривиальное название глутаминсинтетаза: АТФ + L-глутамат + NH₄⁺ $\leftrightarrow$ АДФ + ортофосфат + L-глутамин.

2) Наименование фермента имеет 2 части. Первая - наименование субстрата или субстратов. Вторая, оканчивающаяся на -аза, показывает тип катализируемой реакции.

3) Дополнительная информация, например, малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая): L-малат + НАД⁺ $\rightarrow$ пируват + CO₂ + НАДН + H⁺.

4) Каждый фермент по классификации ферментов (КФ, ЕС) обозначается четырьмя цифрами: 1-класс, 2-подкласс, 3-подподкласс, 4-номер фермента в списке. Так, КФ 2.7.1.1. означает: класс 2 - трансферазы, подкласс 7 (перенос фосфата), подподкласс 1 (алкогольная группа - акцептор фосфата). Конечное название - гексокиназа, или АТФ:D-гексоза-6-фосфотрансфераза, фермент, катализирующий перенос фосфата с АТФ на гидроксильную группу у 6 углеродного атома глюкозы.

Единицы измерения активности и количества ферментов. Для выражения концентрации фермента рекомендуется стандартная единица (Е).

1) За единицу любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту (мкмоль/мин). Для выражения активности фермента пользуются удельной и молекулярной активностями. 2) Удельную активность фермента принято выражать числом единиц ферментативной активности на 1 мг белка.

3) Число молекул субстрата, подвергающихся, превращению одной молекулой фермента в минуту, принято называть числом оборотов, или молекулярной активностью. 4) Предложено новое определение международной единицы фермента, катал (кат), соответствующее количеству фермента, способному вызывать превращение 1 моль субстрата в продукт в 1 сек. (1 моль/с). $1 \text{ E} = 16,67 \text{ нкат}$. Удельная активность кат/кг активного белка. Рекомендуются проведение измерений единиц фермента при 25°C , оптимуме pH и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения. В этом случае скорость соответствует нулевому порядку реакции в отношении субстрата и будет зависеть только от концентрации фермента.

В клетках микроорганизмов обнаружено более 1000 видов ферментов. В одной клетке содержится около 100000 молекул ферментов. Каждую реакцию в клетке могут катализировать 50-100 молекул соответствующего фермента. Содержание каждого фермента в клетке составляет 0,1-5,0% общего количества белка.

Источники ферментов. Ферменты животного происхождения преимущественно выделяют из органов, в которых протекают интенсивные биохимические процессы. Из слизистой желудка свиней и крупного рогатого скота получают препарат пепсин. Из поджелудочной железы свиней получают смеси трипсина, химитрипсина, липаз и амилаз (гликозидаз). Из желудка телят выделяют сычужный фермент, широко используемый в сыроделии. Из ферментов растительного происхождения наиболее широко в народном хозяйстве используют амилазы и папаин. Условно ферментным препаратом можно назвать и ячменный солод, в котором содержится до 1% амилаз. Растительный протеолитический фермент – папаин – содержится в плодах дынного дерева. В США ежегодно расходуют около 100 т папаина для обработки (тендеризации, т.е. размягчения) мяса. Папаин при комнатной температуре за 2 часа расщепляет белки соединительной ткани (коллаген, эластин); аналогично действуют протеиназы фицин (из фигового дерева) и бромелин (из ананаса). Из растительного сырья получают также фосфатазы (картофель), пероксидазы (хрен), уреазы (Канавалия мечевидная), амилазы (ячмень).

Содержание ферментов в растениях низкое и получение ферментов из растений носит сезонный характер. Органы животных получают на мясокомбинатах, но при этом возникают проблемы с консервированием и хранением этого вида сырья. Перспективно получение ферментов микробиологическим путем. Технологии генетической инженерии позволяют целенаправленно увеличивать выход необходимого фермента. Кроме того, среди микроорганизмов находят формы, живущие в экстремальных условиях (термофилы, галлофилы и др.). Из них выделяют ферменты с улучшенными свойствами – термостабильные, осмоустойчивые, кислото- и щелочеустойчивые. Для биотехнологии важно, что микроорганизмы могут выделять ряд ферментов из клеток в окружающую среду; это делает этапы выделения и очистки ферментов более технологичными.

Иммобилизованные ферменты – это ферменты, сохраняющие свою активность при связывании с нерастворимыми носителями (1971 г., Первая конференция по инженерной энзимологии). Преимущества иммобилизованных ферментов:

- являются гетерогенными катализаторами, легко отделяющимися от реакционной среды;
- возможны направленные изменения свойств фермента;
- долговечность и стабильность ферментативного препарата;
- технологичность применения и экономическая выгода.

Ферменты иммобилизуются двумя способами – без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы – адсорбция ферментов на нерастворимых носителях; иммобилизация фермента путем включения в гель, иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры) или с образованием ковалентной связи между ними (иммобилизация на носителях, обладающих гидроксогруппами – бромциановый метод; обладающих аминогруппами; обладающих активированными производными карбоксильной группы; иммобилизация на носителях со свободными сульфгидрильными группами (через образование дисульфидных связей).

Методы иммобилизации универсальны для всех видов иммобилизованных биокатализаторов – индивидуальных ферментов, клеток, субклеточных культур, комбинированных препаратов. Использование иммобилизованных клеток удобно, поскольку отпадает необходимость выделения, очистки и хранения изолированного фермента.

Согласно Егоровой Т.А. и соавт. (2003), иммобилизованные клетки микроорганизмов применяют для биотрансформации органических соединений, разделения рацемических смесей, гидролиза ряда сложных эфиров, инверсии сахарозы, восстановления и гидроксирования стероидов. Иммобилизованные хроматофоры используют в лабораторных установках для синтеза АТФ, а пурпурные мембраны – для создания искусственных фотоэлектрических преобразователей – аналогов солнечных батарей. Разрабатывается реактор на основе иммобилизованных клеток дрожжей для получения этанола из мелассы, в котором дрожжи сохраняли бы способность к спиртовому брожению в течение 1800 ч. Из более чем 2000 известных в настоящее время ферментов иммобилизована и используется для целей инженерной энзимологии примерно десятая часть (преимущественно оксидоредуктазы, гидролазы и трансферазы).

Для осуществления химических процессов с помощью иммобилизованных ферментов применяют колоночные, трубчатые, пластинчатые и танкерные реакторы разного объема и производительности. Иммобилизованные ферментные системы функционируют в биореакторе в виде неподвижной фазы, через которую протекает среда с субстратом, подлежащим химическому превращению (гетерогенный катализ).

В настоящее время в мире разработаны следующие крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов и клеток:

- получение глюкозофруктозных сиропов;
- получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей;
- синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония;
- синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты;
- синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты;
- получение безлактозного молока;
- получение сахаров из молочной сыворотки;
- получение 6-аминопенициллиновой кислоты.

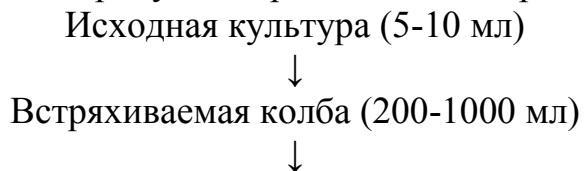
Высокая эффективность биологических катализаторов и специфичность их действия делают ферменты идеальными реагентами для аналитической химии. Сейчас созданы искусственные аналитические системы различных конструкций (биосенсоры, датчики, ферментные электроды, проточные анализаторы), содержащие иммобилизованные ферменты и клетки и предназначенные для автоматического детектирования продуктов энзиматического превращения. Точность определения достигается за счет специфичности ферментативного определения вещества. Начаты разработки новых поколений биодатчиков на базе аффинных взаимодействий (биосродства) типа фермент-ингибитор, антиген-антитело, агонист (антагонист)-клеточный рецептор, а также на основе полупроводниковых структур и мезоэлектрического эффекта. Последние два биодатчика дают возможность создавать сенсоры, чувствительные к газам. Это имеет существенное значение для создания роботов, реагирующих на изменение внешних воздействий.

Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов помогают выполнять десятки быстрых и точных анализов при диагностике заболеваний, контролировать содержание вредных веществ (инсектицидов, пестицидов, удобрений) в пищевых продуктах и в воздухе. Биосенсоры нашли применение в решении аналитических задач в химической и микробиологической промышленности, а также в научных исследованиях.

Важную роль в медицине играют исследования по направленному транспорту лекарственных веществ. Чаще используют инкапсулированные ферменты – протеолипосомы. Протеолипосомы, заполненные ферментом аспарагиназой, переносятся кровотоком к зонам скопления аспарагина и поэтому применяются для лечения аспарагинзависимых опухолей. Колонки, заполненные микрокапсулами с ферментом, используют для диализа в аппарате «искусственная почка», которая работает в десятки раз эффективнее обычного аппарата.

Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов.

Обобщенная схема промышленного выращивания микроорганизмов с целью получения конечных продуктов представлена на рис 9.



Ферментер для посевного материала (10-100 л)



Промышленный ферментер (>100 л)



Сбор биомассы



Клетки (Культуральная среда)



Разрушение (экстракция)



Очистка продукта

Рис. 9. Схема промышленного выращивания микроорганизмов.

Переход от лабораторного синтеза к промышленному – это не просто увеличение масштаба, т.е. условия, оптимальные для малых объемов не будут оптимальными для больших. Например, аэробные микроорганизмы хорошо растут в обычной колбе на 200 мл при аэрации ее содержимого с помощью мешалки мощностью 300 Вт. Если просто увеличить объем «колбы» до 10000 литров, то потребуется мешалка мощностью 15 МВт. Ее мотор будет размером с дом, а при перемешивании выделяется столько тепла, что микроорганизмы погибнут. Поэтому для получения максимального выхода как в малых (от 1 до 10 л), так и в больших (>1000 л) биореакторах необходимо оптимизировать множество параметров: температуру, pH, способ и интенсивность перемешивания и (в случае аэробных организмов) – концентрацию кислорода. Считают, что оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора. Промышленное выращивание микроорганизмов с целью получения очищенного продукта – *ферментация* – процесс многоступенчатый (рис. 9). Обычно процедура начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Сначала выращивают исходную культуру (5-10 мл), затем инкубируют ее во встряхиваемой колбе (200-1000 мл), после чего переносят в ферментер для посевного материала (10-100 л) и, наконец, в промышленный ферментер (1000-1000000 л). По завершении ферментации клетки выделяют из культуральной среды центрифугированием или фильтрацией. Если продукт локализован внутри клеток, последние разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукт из осветленной среды. Секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды.

Рост и развитие микроорганизмов. В последние 15 лет для выращивания продуцентов ферментов чаще используют глубоинный метод культивирования (рис. 10). В промышленных условиях для этих целей применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

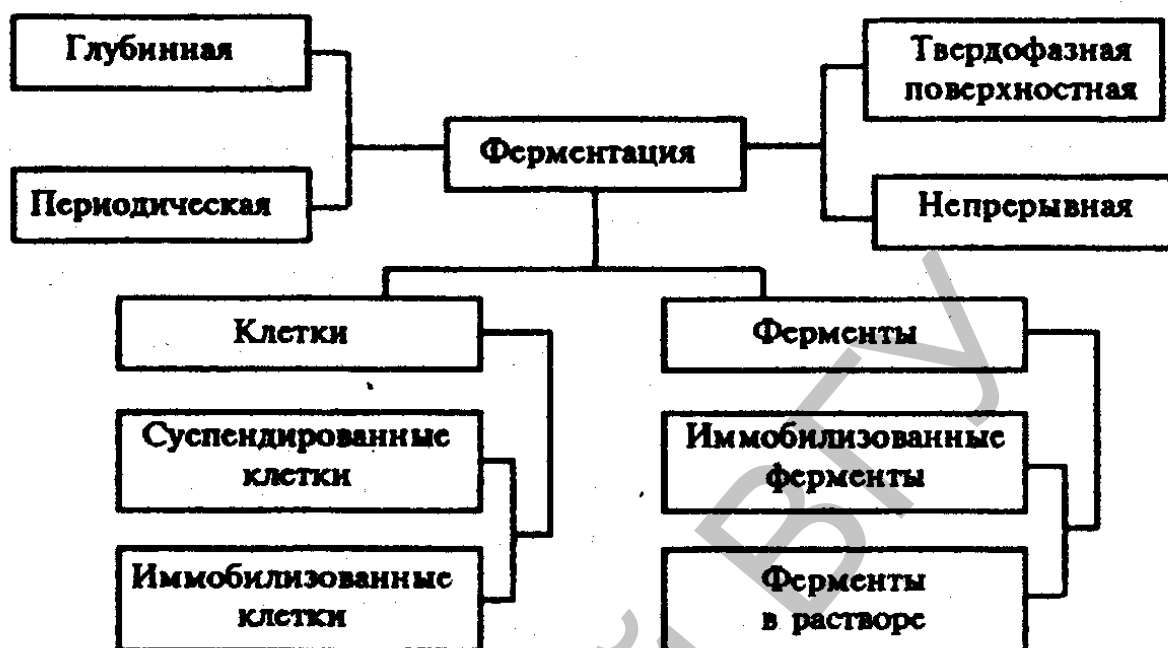


Рис. 10. Методы ферментации (Голубев В.Н., Жиганов И.Н., 2001).

Сначала ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения контаминации (инфекции) в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями pH, температуры, редокс-потенциала и другими условиями культивирования (рис. 11). В настоящее время наиболее прогрессивным признан проточный метод культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер как питательной среды, так и посевного материала.

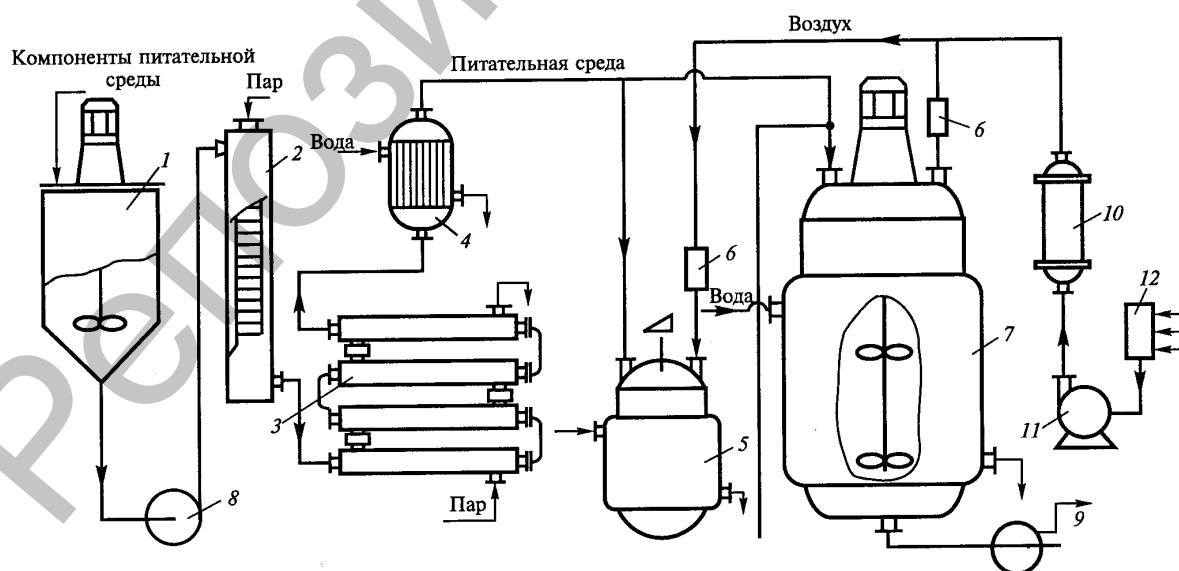


Рис.11. Принципиальная схема глубинного культивирования микроорганизмов (Т.А.Егорова и соавт., 2003): 1 – смеситель питательной среды; 2 – стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды;

3,4 – теплообменники; 5 – посевные аппараты; 6, 10, 12 – фильтры для очистки воздуха; 7 – ферментер; 8,9 – насосы;

Микроорганизмы можно выращивать:

- в ферментере периодического действия (микроорганизмы выращивают без добавления свежей культуральной среды);
- в ферментере периодического действия с добавлением субстрата (периодически добавляют увеличивающиеся количества питательных веществ, но культуральную среду не удаляют до конца процесса);
- в непрерывной культуре (свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, и параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии).

В ходе *периодической ферментации* различают *шесть* основных фаз роста:

- лаг-фазу (наблюдается, когда посевной материал получен из культуры, рост которой прекратился в результате исчерпания субстрата или ингибирования продуктом);
- фазу ускорения (скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины);
- логарифмическую (экспоненциальную) фазу (клетки претерпевают несколько делений, а удельная скорость роста остается постоянной);
- фазу замедления (кратковременная при истощении субстрата);
- стационарную фазу (биомасса остается постоянной, но метаболизм резко меняется – синтез вторичных метаболитов, например, антибиотиков);
- фазу отмирания (исчерпание энергетических запасов клетки и прекращение метаболизма).

Кривую роста в логарифмической фазе описывают математически. Прирост клеточной массы во времени dX/dt равен произведению удельной скорости роста μ на биомассу X :

$$dX/dt = \mu X$$

Аналогично, прирост числа клеток dN/dt равен произведению удельной скорости μ на число клеток N :

$$dN/dt = \mu N$$

Удельная скорость μ зависит от концентрации лимитирующего субстрата (источника углерода или азота) S , максимальной удельной скорости роста μ_{max} и субстратспецифичной константы K_s :

$$\mu = \mu_{max} S / (K_s + S).$$

И S , и K_s имеют размерность г/л или моль.

Иногда вместо удельной скорости роста используют время удвоения, или время генерации $t_d = \ln 2 / \mu$. Это время, за которое в определенных условиях число клеток или биомасса удваиваются. Для одноклеточных микроорганизмов величина μ_{max} обычно находится в диапазоне $2,1-0,086 \text{ ч}^{-1}$, что соответствует времени удвоения примерно от 20 мин до 8 ч. Когда субстрат присутствует в избытке (т.е. при $S \gg K_s$), $\mu = \mu_{max}$ и достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе. Как правило, величина K_s настолько мала, что концентрация субстрата редко

становится сравнимой с K_s во время экспоненциальной фазы. Например, в случае *E. coli* K_s для глюкозы равна примерно 1 мг/мл, а начальная концентрация глюкозы в среде обычно составляет около 10000 мг/л. Однако в конце экспоненциальной фазы субстрата остается мало, и S может стать ниже K_s (в этом случае быстро наступает фаза замедления).

Периодическая культура с добавлением субстрата – в ферментер периодически добавляют субстрат, а конечный продукт собирают только по завершении процесса. Добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз и к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы (например, антибиотиков). Однако в стационарной фазе микроорганизмы часто синтезируют протеолитические ферменты, разрушающие все производимые ими белки. Поэтому в случае получения белка как целевого продукта, следует остановить процесс до его перехода в стационарную фазу. Периодическую ферментацию с добавлением субстрата можно использовать для культивирования не только микроорганизмов, но и клеток млекопитающих и насекомых.

При непрерывной ферментации стационарные условия обеспечиваются тем, что при постоянном объеме биореактора убыль числа клеток (удаление продукта) в точности уравнивается их увеличением в результате деления. Чтобы получить непрерывную культуру с постоянными гидродинамическими характеристиками, нужно создать условия, при которых удельная скорость роста была бы ниже максимальной величины μ_{max} . Для этого нужна тщательная регулировка насоса подачи, чтобы объем культуры в биореакторе поддерживался постоянным. Получение продукта в ферментере непрерывного типа дешевле, чем в периодических из-за уменьшения объема биореактора, отсутствия простоя и сохранения физиологического статуса культивируемых клеток на одинаковом уровне. Непрерывная ферментация может продолжаться 500-1000 ч, что создает проблему поддержания стерильности промышленной установки.

В таблице 5 приведены основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов.

Таблица 5

Факторы среды, определяющие функционирование продуцентов (по В.Н.Голубеву и И.Н.Жиганову, 2001)

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивают метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации; непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и др.
Концентрация продукта и	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления; ферментация с

ингибиторов		диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
pH	Оптимизирует скорости биохимических реакций (пределы pH 3,5-9,0)	Регулирование путем добавления кислоты или щелочи
Температура	Оптимизирует скорость биохимических реакций (20-70 °C)	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости при помощи теплообменников или температуры подаваемых в биореактор субстратов
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (0,6-0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавления отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором H^+ ; ингибирует развитие анаэробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивностью аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода; при атмосферном давлении и 20 °C в 1 л среды растворяется 0,28 ммоль (0,008 г/л) O_2 . Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде, что достигается продуванием N_2 и CO_2 или добавками восстановителей (цистеина, аскорбиновой кислоты и др.)
Содержание диоксида углерода	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	Организуют макро- и микроперемешивание в биореакторах при помощи механических мешалок, барботажных, циркуляционных и других систем. Аэрация способствует перемешиванию, а пенообразование – флотации продуцента; флокуляция способствует осаждению

		биомассы
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента	Регулирование компонентами питания, характером и концентрацией биомассы, а также наличием некоторых полимерных экстрацеллюлярных продуктов. Вязкость влияет на перемешивание и аэрацию, для чего требуются специальные технические средства

Культуры с высокой плотностью. Считают, что при получении белков максимальный выход конечного продукта напрямую связан с плотностью культуры клеток. В ферментерах периодического действия с добавлением субстрата концентрация рекомбинантных клеток *E.coli* достигает 50 г сухого вещества на 1 л среды (в некоторых случаях >100 г/л). Заметим, что вес сухого вещества клеток *E.coli* составляет примерно 20-25% веса влажного вещества. Один из способов повышения плотности культуры состоит в регулировании культуральной среды. Известно, что избыточное введение питательных веществ, например источников углерода, тормозит рост клеток при концентрациях: глюкоза >50 г/л, аммиак >3 г/л, железо >1,15 г/л, магний >8,7 г/л, фосфор >10 г/л, цинк >0,38 г/л. В культурах с высокой плотностью может возникнуть недостаток кислорода (усилить подачу воздуха, заменить воздух на кислород или экспрессировать в клетках *E.coli* ген гемоглобина *Vitreoscilla*, обладающего большим сродством к кислороду. Высокой плотности чаще всего удается достичь при росте в периодическом режиме с добавлением субстрата. Режим подачи питательных веществ может быть непрерывным, ступенчатым или экспоненциальным.

Биореакторы делят на три основных группы (рис.12):

- реакторы с механическим перемешиванием;
- барботажные колонны, через которые для перемешивания содержимого пропускается воздух или другой газ;
- аэролифтные (эрлифтные) реакторы с внутренней или внешней рециркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком газа (обычно воздуха), за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

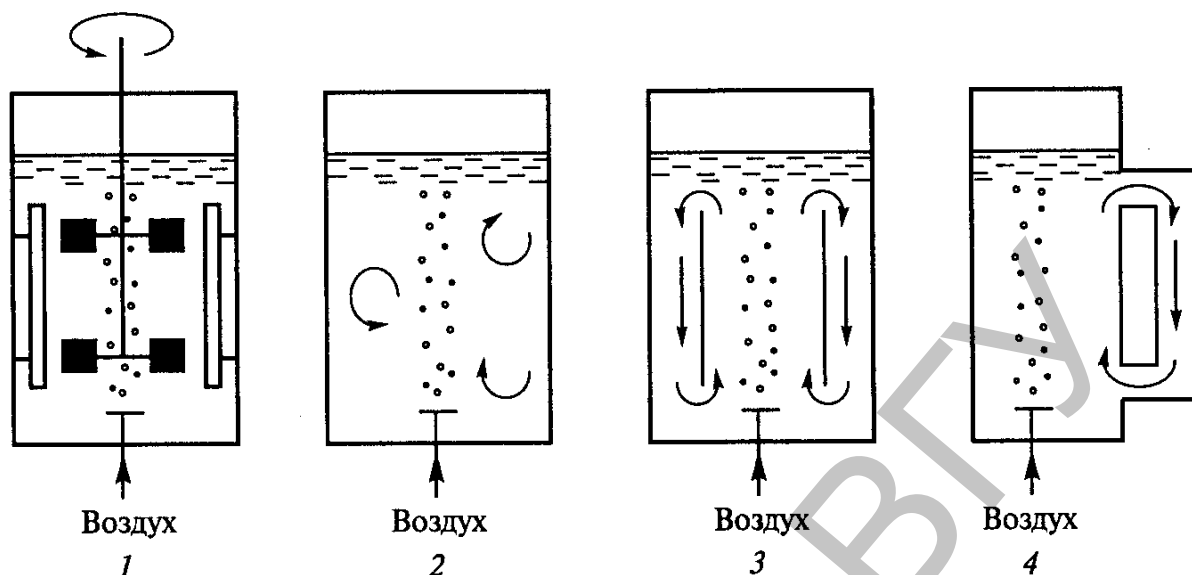


Рис. 12. Схема работы основных типов биореакторов (Т.А.Егорова и соавт., 2003): 1) биореактор с механическим перемешивающим устройством; 2) барботажный биореактор; 3) аэролифтный биореактор; 4) биореактор с вынесенной циркуляционной петлей

Чаще всего используются биореакторы с механическим перемешиванием, поскольку они имеют следующие преимущества:

- позволяют легко менять технологические условия;
- всегда есть в продаже;
- обеспечивают эффективную доставку газа к растущим клеткам (если говорить на инженерном языке, обладают высоким объемным коэффициентом массообмена);
- имеется большой опыт их промышленного использования с соответствующей регламентационной литературой.

В реакторах с механическим перемешиванием газ (как правило, воздух) подают в культуральную среду под давлением через разбрызгиватель – кольцо с множеством маленьких отверстий либо трубку с одним отверстием. В первом случае образуются мелкие пузырьки воздуха и обеспечивается их более равномерное распределение, однако разбрызгиватели в виде трубок используются чаще, поскольку они реже закупориваются. Для равномерного распределения газа по всему объему биореактора используются мешалки – одна или несколько. Они разбивают крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. Многие культуральные среды агрессивны, поэтому стенки биореакторов делают из нержавеющей стали. Стекланные части используют только в лабораторных биореакторах емкостью менее 50 л. Размер биореактора лимитируется его способностью эффективно отдавать тепло, выделяемое микроорганизмами в ходе метаболизма и высвобождаемое в результате перемешивания. Известно, что ассимилируя 1 кг сахара, микроорганизмы выделяют 4-6 тысяч кДж тепла.

Обеспечение стерильности, постоянства pH и температуры – ключевые требования при любом способе культивирования независимо от конструкции биореактора.

В молекулярной биотехнологии биореакторы с механическим перемешиванием используются в меньшей степени из-за грубого воздействия на клетки:

- клетки рекомбинантных микроорганизмов более хрупки, чем нетрансформированные клетки, поскольку часть их энергетических ресурсов расходуется на синтез чужеродных белков и в результате образуется менее прочная клеточная стенка;

- самый распространенный ответ клетки на внешнее воздействие – уменьшение количества синтезируемых белков, в том числе и рекомбинантных;

- под действием сдвиговых эффектов могут изменяться физические и химические свойства клеток, что затруднит дальнейшую работу с ними, например, может увеличиться количество полисахаридов на поверхности клеток (это приведет к ухудшению условий их выделения и лизиса, а также затруднит очистку рекомбинантного белка).

Рекомбинантные микроорганизмы широко используются для получения разнообразных белковых продуктов, применяющихся в медицине (например, инсулина), а также в качестве своего рода «фабрик» по производству имеющих коммерческую ценность метаболитов (например, антибиотиков). Белки синтезируются наиболее интенсивно от середины экспоненциальной фазы до ее завершения, а метаболиты – в период замедления роста и в стационарной фазе.

Выделение целевого продукта следует за этапом ферментации.

1. Отделение клеток от культуральной жидкости после ферментации осуществляют методами скоростного центрифугирования или фильтрацией. Центрифугирование не всегда доступно из-за стоимости оборудования; метод фильтрации не всегда эффективен из-за снижения фильтрационной способности пористого материала, заполняемого клетками.

2. Выделение продукта зависит от его локализации. Если продукт представляет собой белок, находящийся в культуральной среде, то среду концентрируют, а белок очищают хроматографическими или другими препаративными методами. Если продукт – это низкомолекулярное соединение, находящееся в культуральной среде, то используют соответствующие методы экстракции. Если продукт имеет внутриклеточную локализацию, то прежде чем очищать его, клетки разрушают.

3. Разрушение клеток осуществляют химическими, биологическими и физическими методами. В качестве примера приведена схема ферментативного лизиса дрожжевой клетки (рис.13). При проведении лизиса в гипертонической среде и высокой активности литических ферментов клеточная стенка может быть полностью лизирована, и из клетки образуется протопласт, принимающий затем сферическую форму. При перенесении в

гипотоническую среду сферопласты мгновенно лизируются под действием осмотических сил.

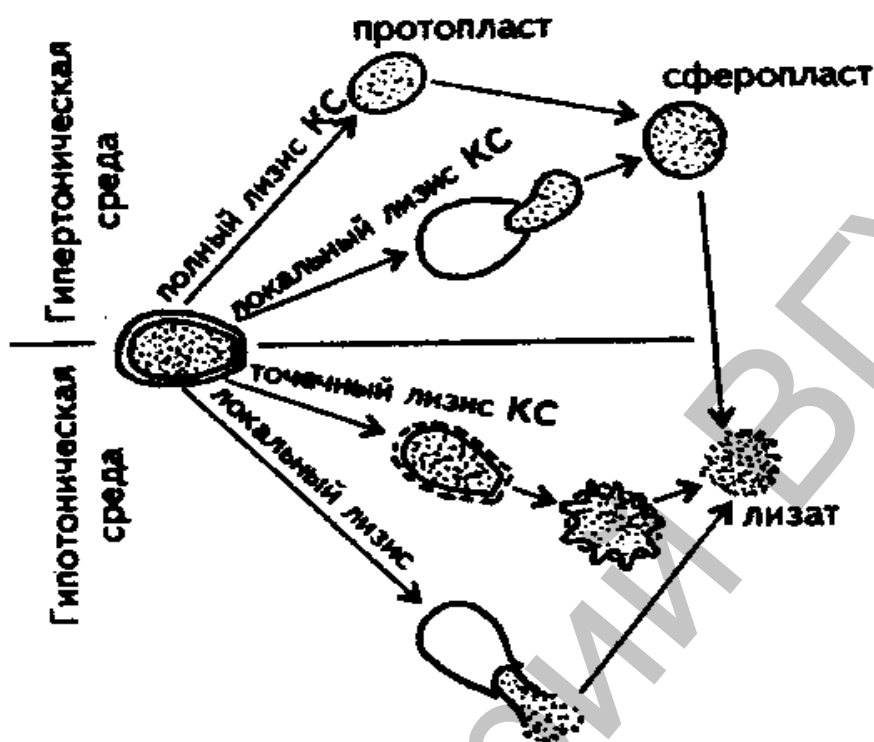


Рис. 13. Схема ферментативного лизиса дрожжевой клетки (Кислухина О.В., 2002).

Все процедуры должны быть достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и в то же время достаточно мягкими, чтобы исключить денатурацию белка. В связи с разным строением клеточных стенок у разных микроорганизмов существуют разные подходы к их разрушению:

- У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных пептидными мостиками.
- У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тоньше и покрыта снаружи слоем липидов.
- Стенка дрожжевых клеток состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннанов и β -гликанов.
- Низшие грибы имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из α - и β -гликанов, гликопротеинов и хитина.

Химические методы разрушения – обработка щелочью, органическими растворителями или детергентами. Все эти методы не должны отрицательно влиять на целевой белковый продукт. Основной биологический метод разрушения клеток микроорганизмов является лизис с помощью ферментов. Лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий, для лизиса грамотрицательных бактерий к яичному лизоциму добавляют этилендиаминотетрауксусную кислоту (ЭДТА,

трилон Б). Клеточные стенки дрожжей гидролизуют с помощью одного или нескольких ферментов – β -1,3-глюканазы, β -1,6-глюканазы, манназы и хитиназы. Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис проходит в мягких условиях, но сдерживает их применение высокая стоимость. Дешевле клетки разрушать с помощью физических методов – осмотический шок, замораживание-оттаивание, ультразвуковая обработка. Для разрушения большого количества клеток используют шаровые мельницы. При гомогенизации под высоким давлением концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое отверстие под высоким давлением, а затем давление резко сбрасывают, что вызывает лизис. В методе соударения клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность или навстречу потоку другой суспензии. В месте соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. Эффективно сочетание метода обработки лизоцимом с соударением (с уменьшением дозы и скорости струйного выброса) для сохранения нативности целевого продукта.

4. Затем следуют этапы очистки белка, а если получен нерастворимый продукт, то его солубилизации обычными приемами препаративной биохимии.

Оценка процесса ферментации осуществляется путем анализа ряда кинетических показателей. Практически в ферментационной среде контролируют содержание основных субстратов (обычно источник углеводов), биомассы и целевого продукта. По этим показателям вычисляют удельную скорость роста, продуктивность системы по биомассе и продукту, а также экономические коэффициенты (таблица 6).

Биотехнологические штаммы микроорганизмов. Микроорганизмы, способные синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности (сверхсинтез), часто встречаются в природе. Некоторые из них при выделении в окружающую среду оказываются токсичными для других видов (органические кислоты, спирты, антибактериальные вещества) и служат средством защиты. Микроорганизмы с такими свойствами были первыми привлечены к хозяйственной деятельности человека. В настоящее время природные штаммы микроорганизмов используют для производства микробной биомассы (микробного белка), бактериальных азотистых удобрений, биопестицидов, пищевых продуктов. Однако большинство промышленных микроорганизмов представлено искусственно селективными штаммами.

Таким образом, в промышленности применяют три вида штаммов: природные штаммы, улучшенные естественным или искусственным отбором; штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций, и штаммы культур, полученные методами генной или клеточной инженерии. В таблице 7 представлены некоторые группы микроорганизмов, используемые для промышленного синтеза веществ.

Основные показатели процесса ферментации

Показатель	Символ и ед. изм.	Расчетная формула	Примечание
Концентрация биомассы:	X , г/л	$X_1 = X_0 e^{\mu(t_1 - t_0)}$	Для логарифмической фазы роста $e=2,718$
субстрата	S , г/л		
продукта	P , г/л		
Удельная скорость роста	μ , 1/ч	$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	—
Коэффициент разбавления	D , 1/ч	$D = \mu$	Для непрерывного процесса
Продуктивность по биомассе	Q_x , г/(л·ч)	$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$	Для периодического процесса
		$Q_x = DX$	Для непрерывного процесса
То же по продукту	Q_p , г/(л·ч)	$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0}$	Для периодического процесса
		$Q_p = DP$	Для непрерывного процесса
Удельная скорость потребления субстрата	q_s , г/(л·ч)	$q_s = \frac{S_0 - S_1}{X_1(t_1 - t_0)}$	—
Выход продукта из субстрата	$Y_{p/s}$, г/г	$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}$	—
Выход биомассы из субстрата	$Y_{x/s}$, г/г	$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$	—
Удельная скорость образования продукта	q_p , г/(г·ч)	$q_p = \frac{P_1 - P_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	—

Заимствовано из монографии: В.Н.Голубев, И.Н.Жиганов Пищевая биотехнология, 2001.

Экологически чистая энергия. Биогаз. В настоящее время очевидно, что окружающая среда – воздух, земля вода – уже не могут эффективно «перерабатывать» бытовые, промышленные и сельскохозяйственные отходы. Поэтому создан ряд технологических, включая биотехнологические, подходов, с помощью которых планируется перерабатывать большие количества отходов (например, лигноцеллюлозы) и токсических веществ.

Группы микроорганизмов, используемые для промышленного биосинтеза

Продуцент	Продукт
Дрожжи	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Этанол, глицерин
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Этанол
<i>Kl. lactis</i>	Этанол
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Этанол
<i>Candida lipolytica</i>	Лимонная, изолимонная, пировиноградная кислоты
Бактерии	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Ацетон, бутанол
<i>Cl. thermohydrosulfuricum</i>	Этанол, уксусная, молочная кислоты
<i>Cl. thermosaccharolyticum</i>	Глюкоза, ксилоза, этанол,
<i>Cl. auranticum</i>	Изопропанол
<i>Cl. thermoacticum</i>	Уксусная кислота
<i>Cl. propionicum</i>	Пропионовая, акриловая кислоты
<i>Xanthomonas campestris</i>	Полисахариды
<i>Zymomonas mobilis</i>	Этанол, сорбит, глюконовая кислота, леван
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Этанол, уксусная, молочная кислоты
<i>Dunaliella sp.</i>	Глицерин
<i>Aerobacter aerogenes</i>	2,3-бутандиол
<i>Bacillus polymixa</i>	2,3-бутандиол
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Молочная кислота
<i>Acetobacter curvum</i>	Уксусная кислота
Микромицеты (плесневые грибы)	
<i>Aspergillus niger</i>	Лимонная, щавелевая кислоты
<i>As. terreus</i>	Итаконовая кислота
<i>As. oryzae</i>	Ферментные препараты (амилаза)
<i>As. awamori</i>	Ферментные препараты (пектиназа)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ферментные препараты (липаза)

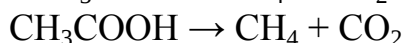
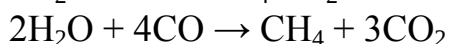
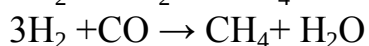
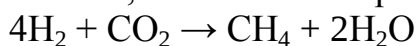
(Таблица заимствована из монографии Голубева В.Н. и Жиганова И.Н., 2001).

Определим основные термины:

- биодegradация – разрушение отходов, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов;
- биомасса – совокупность веществ и материалов – побочных продуктов пищевой и перерабатывающей промышленности, - которые

раньше считались отходами, а теперь могут служить сырьем для производства многих важных для народного хозяйства продуктов.

Экологически чистую энергию можно получать путем преобразования солнечной энергии в электрическую с помощью солнечных коллекторов, использования энергии ветра, приливов, а также из биогаза и микробного этанола. По Т.А.Егоровой и соавт. (2003) биогаз – это смесь из 65% метана, 30% CO₂, 1% сероводорода и незначительных примесей азота, кислорода, водорода и угарного газа. Энергия, заключенная в 28 м³ биогаза, эквивалентна энергии: 16,8 м³ природного газа; 20,8 л нефти; 18,4 л дизельного топлива. В основе получения биогаза лежит процесс метанового «брожения». Биометаногенез – сложный микробиологический процесс, в котором органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в анаэробных условиях. Микробиологическому анаэробному разложению поддаются практически все соединения природного происхождения, а также значительная часть ксенобиотиков органической природы. В анаэробном процессе биометаногенеза выделяют три последовательные стадии, в которых участвуют свыше 190 различных микроорганизмов. На первой стадии под влиянием экстрацеллюлярных ферментов ферментативному гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения – белки, липиды и полисахариды. Вместе с гидролитическими бактериями функционируют и микроорганизмы-бродильщики, которые ферментируют моносахариды, органические кислоты. На второй стадии (ацидогенез) в процессе ферментации участвуют две группы микроорганизмов: ацетогенные и гомоацетогенные. Ацетогенные H₂-продуцирующие микроорганизмы ферментируют моносахариды, спирты и органические кислоты с образованием H₂, CO₂, низших жирных кислот, в основном ацетата, спиртов и некоторых других низкомолекулярных соединений. Деградация бутирата, пропионата, лактата с образованием ацетата происходит при совместном действии ацетогенных H₂-продуцирующих и H₂-утилизирующих бактерий. Гомоацетатные микроорганизмы усваивают H₂ и CO₂, а также некоторые одноуглеродные соединения через стадию образования ацетил-КоА и превращения его в низкомолекулярные кислоты (в основном, в ацетат). На заключительной третьей стадии анаэробного разложения отходов образуется метан. Он может синтезироваться через стадию восстановления CO₂ молекулярным водородом, а также из метильной группы ацетата. Некоторые метановые бактерии способны использовать в качестве субстрата формиат, CO₂, метанол, метиламин и ароматические соединения:



Метанобразующие бактерии 90-95% углерода субстратов превращают в метан. На рисунке 14 представлена схема устройства реактора

(метантенка) для обработки сельскохозяйственных отходов (навоз, остатки растениеводства).

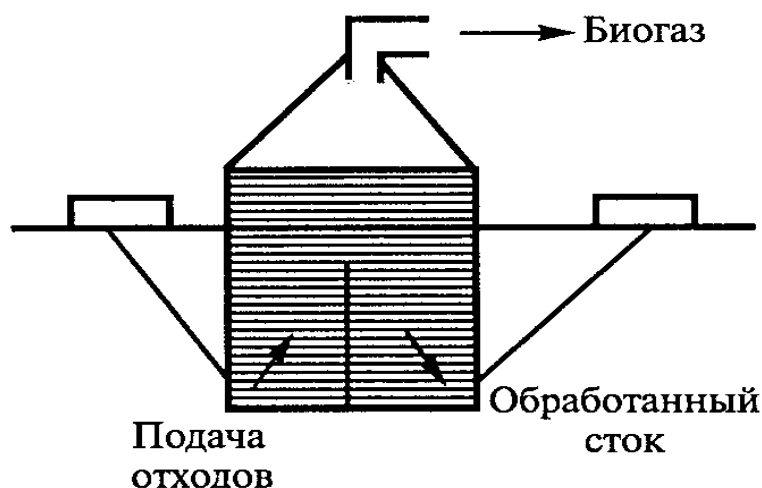


Рис. 14. Схема устройства реактора для обработки сельскохозяйственных отходов (Егорова Т.А. и соавт., 2003).

Процесс метанообразования ведется при 30-60 °С и рН 6-8. В настоящее время для производства биогаза чаще используют вторичные отходы (отходы животноводства и сточные воды городов), чем первичные (отходы зерноводства, полеводства, пищевой, микробиологической, лесной промышленности). Использование термофильных метанообразующих бактерий позволяет вести процесс при 50-60 °С, что обеззараживает субстрат метанообразования от патогенной микрофлоры и гельминтов. В целом анаэробная конверсия органических отходов в метан – наиболее конкурентноспособная область биоэнергетики. Основное преимущество биогаза состоит в том, что он является возобновляемым источником энергии, связанным с существованием жизни на земле.

Дегградация ксенобиотиков с помощью микроорганизмов. На протяжении 20 века нарастало загрязнение окружающей среды ксенобиотиками (неприродные, синтетические химические вещества; от греч. *Xenos*, чужой) – гербицидами, пестицидами, хладагентами, растворителями и т.д. Так, например, в 1985 г. мировое производство лишь одного из загрязнителей окружающей среды – пентахлорфенола, составило более 50000 т. Традиционные методы разрушения, сжигания или химической модификации ксенобиотиков приводили к дальнейшему загрязнению окружающей среды. Определенный позитивный сдвиг в технологиях борьбы с химическим загрязнением окружающей среды проявился в середине 60-х годов прошлого века, когда были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные к дегградации ксенобиотиков.

Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*, разные штаммы которых способны расщеплять более 100 органических соединений. Нередко

один штамм использует в качестве источника углерода несколько родственных соединений.

В биodeградации сложной органической молекулы обычно участвуют несколько ферментов. Кодрующие их гены входят в состав крупных (50-2000 т.п.н.) плазмид, а иногда обнаруживаются как в хромосомной, так и в плазмидной ДНК.

Бактерии, разрушающие негалогенированные ароматические соединения, как правило, превращают их в катехол или протокатехоат, а затем в ходе нескольких реакций окислительного расщепления, - в ацетил-КоА и сукцинат или в пируват и ацетальдегид. Полученные вещества легко метаболизируются всеми микроорганизмами. Галогенированные ароматические соединения (пестициды, гербициды) деградируются теми же ферментами, но скорость их превращений зависит от числа атомов галогена в исходном ксенобиотике. Дегалогенирование происходит с помощью неспецифической диоксигеназной системы микроорганизмов.

Некоторые микроорганизмы обладают природной способностью к деградации различных ксенобиотиков; следует иметь в виду, что:

- ни один из микроорганизмов не может разрушать все органические соединения;
- некоторые органические соединения в высокой концентрации подавляют рост деградирующих их микроорганизмов;
- обычное загрязнение окружающей среды многокомпонентное, когда один из компонентов может подавлять жизнедеятельность деградирующих другие соединения микроорганизмов.

Заманчиво создать штамм микроорганизмов, способный утилизировать несколько органических веществ-ксенобиотиков. Для этого используют два подхода.

1. Метод конъюгации обеспечивал перенос из клетки в клетку целых плазмид. А.М.Чакрабартти, проводивший эксперименты по переносу плазмид-разрушительниц, т.е. плазмид, кодирующих все ферменты пути биodeградации определенного соединения, сконструировал штамм, содержащий несколько таких плазмид. Кодруемые плазмидными генами ферменты каждого катаболического пути разрушали определенное органическое соединение. Взяв четыре разные бактерии, он создал один микроорганизм, содержащий плазмиды, которые обуславливали деградацию камфары, октана, салицилата, нафталина (супербацилла была запатентована спустя 11 лет в США). Большинство разрушающих ксенобиотики бактерий, модифицированных путем переноса плазмид, являются мезофильными микроорганизмами (хорошо растут при 20-40 °С), а температура воды в загрязненных реках, озерах и океанах лежит в диапазоне от 0 до 20 °С. Поэтому плазмиду TOL (детерминирует разрушение толуола) мезофильного штамма *Pseudomonas putida* перенесли с помощью конъюгации в психрофильный (с низким температурным оптимумом) штамм, утилизирующий салицилат при температуре, близкой к 0 °С.

Трансформированный штамм оказался способным утилизировать салицилат и толуол в качестве источника углерода при 0 °С.

2. Метод модификации генов, кодирующих ферменты того или иного метаболического пути. Одним из наиболее распространенных веществ, загрязняющих почву и воду, является трихлорэтилен, широко используемый в качестве растворителя и обезжиривающего средства. Он длительное время сохраняется в окружающей среде и относится к канцерогенам. Анаэробные почвенные бактерии способны его дегалогенировать, превращая в еще более токсичное соединение винилхлорид. Некоторые штаммы *Pseudomonas putida*, разрушающие ароматические соединения (толуол), разрушают также и трихлорэтилен. Для разрушения трихлорэтилена из набора ферментов деградации толуола требуется лишь толуолдиоксигеназа. Гены толуолдиоксигеназы ввели в *E.coli* и получили штамм, способный превращать трихлорэтилен до безвредных продуктов.

Утилизация целлюлозы является важным биотехнологическим процессом, поскольку каркас почти всех наземных растений состоит из полимеров: лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы. Объединяясь в разных пропорциях, они образуют лигноцеллюлозный материал, на долю которого приходится основная часть биомассы, остающейся в огромном количестве в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей народного хозяйства.

Лигнин – глобулярный нерегулярный нерастворимый полимер (мол. масса >10000), состоящий из остатков фенилпропана. Лигнин обуславливает ригидность растений, их устойчивость механическим и микробным повреждениям. Гемицеллюлозы – это короткоцепочечные гетерогенные полимеры, состоящие из гексозных и пентозных единиц. Все гемицеллюлозы делят на три типа: 1) ксиланы, остов которых состоит из молекул поли-β-1,4-ксилана с присоединенными к ним арабинозой, глюкуроновой и арабиноглюкуроновыми кислотами; 2) маннаны, состоящие из глюкоманнанов и галактоманнанов; 3) арабиногалактаны. Целлюлоза состоит из длинных цепей, состоящих из остатков D-глюкозы, соединенных β-1,4-гликозидными связями.

Лигноцеллюлозные материалы делят на три класса:

- сами растения, специально выращиваемые для получения целлюлозы, строительных материалов или корма для скота (хлопок, древесина, сено);
- растительные отходы, остающиеся после сбора и переработки урожая и после обработки древесины (солома, рисовая шелуха, древесная щепка и др.);
- бытовые отходы (использованные бумага, картон и др.).

Многие бактерии и грибы способны расщеплять целлюлозу благодаря совместному действию нескольких ферментов, называемых целлюлазами (эндоглюканаза, экзоглюканаза, целлобиогидролаза, целлобиаза). Расщепление целлюлозы с помощью целлюлолитических микроорганизмов происходит медленно и часто не до конца. Предприняты попытки создать с

помощью генной инженерии микроорганизмы, обладающие более высокой целлюлазной активностью. Для этого выделяли про- и эукариотические гены, кодирующие отдельные ферменты целлюлазного комплекса. Так называемые целлюлазные гены экспрессируют в *E.coli* или других микроорганизмах для получения этанола из целлюлозы. Для этого бумажные отходы частично расщепляют целлюлазами и затем проводят ферментацию высвободившейся глюкозы с помощью *S. cerevisiae*. Этот подход позволит получить 400 л этанола из 1 т бумажных отходов. В США за год образуется 100 млн. т бумажных отходов и при такой переработке их можно получить топливный этанол, эквивалентный 16% расходуемого бензина. Введение целлюлазных генов в винные дрожжи позволяет усилить аромат вина.

Питание сельскохозяйственных животных. Получение силоса. Для хранения растительных кормов в течение многих месяцев используют молочнокислые бактерии (растительный материал служит субстратом при синтезе молочной и уксусной кислот). Эти кислоты подавляют рост других микроорганизмов, способствуя сохранению кормовой растительной массы (силоса). Если молочнокислые бактерии присутствуют на свежем растительном материале в небольшом количестве, нужно добавить бактериальный посевной материал (обычно *Lactobacillus plantarum*). Оптимально растительное сырье, содержащее достаточное количество водорастворимых углеводов.

Для создания бактерии, способной осуществлять эффективную ферментацию растительного материала, встроили ген α -амилазы «не силосного» штамма *L. Amylovorus* в хромосомный ген конъюгированной гидролазы желчных кислот одного из штаммов *L. Plantarum*. Этот ген кодирует фермент, который активируется при попадании бактерии в кишечник животного и, следовательно, не нужен при образовании силоса. Предполагается создание штаммов *L. Plantarum*, способствующих более эффективному образованию силоса из сельскохозяйственных культур, содержащих много крахмала (люцерна).

Некоторые виды биомассы (например, сыворотка, целлюлозные отходы) и продукты переработки нефти могут служить субстратом при культивировании микроорганизмов. Предполагалось, что эти чистые культуры, а также их продукты (белок одноклеточных организмов, БОО) можно будет использовать в качестве пищевых добавок или корма для скота. К сожалению, вследствие дороговизны получаемых продуктов, их невысоких вкусовых качеств, а иногда и токсичности производство БОО оказалось экономически нецелесообразным. Технологичность этого процесса может быть оптимизирована путем введения генетически модифицированных микроорганизмов применительно к виду перерабатываемых отходов.

Разработан новый подход, с помощью которого можно будет обеспечивать крупный рогатый скот белком, обогащенным незаменимыми аминокислотами. Простое добавление белков в корм – дорогостоящий и не эффективный способ, поскольку белки и аминокислоты разрушаются бактериями рубца еще до того, как животное успеет их использовать. Кроме

того, основное количество белка они получают не с кормом; его поставляют присутствующие в рубце микроорганизмы. Рацион животных можно обогатить, если направленно модифицировать эти бактерии. Для этого был синтезирован белок из 100 аминокислот, 57 из которых незаменимые. По программе белка синтезировали ген и экспрессировали его в *E.coli*. Если бактерии окажутся способными продуцировать такой белок в рубце животных, будет создан способ непрерывного обеспечения их незаменимыми аминокислотами.

Получение ферментативных препаратов. Технология ферментных препаратов микробного происхождения более сложная, так как дополнительно включает этапы культивирования микроорганизмов-продуцентов ферментов. Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так из других природных источников трудоемкая и многоэтапная процедура. Поэтому, если фермент может использоваться в виде неочищенного препарата, его не очищают. В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1% (99,9% - примеси). К таким отраслям относятся спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, а также сельское хозяйство. В большинстве отраслей пищевой промышленности, в медицине, фармации требуются высокоочищенные ферменты. На рисунке 15 представлена схема получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов. В производственных условиях активность получаемого ферментного препарата оценивают количеством субстрата, преобразованного 1 мг (1 кг) препарата при оптимальных условиях за 1 мин, и измеряют в Е/мг, моль/мг или катал/кг белка.

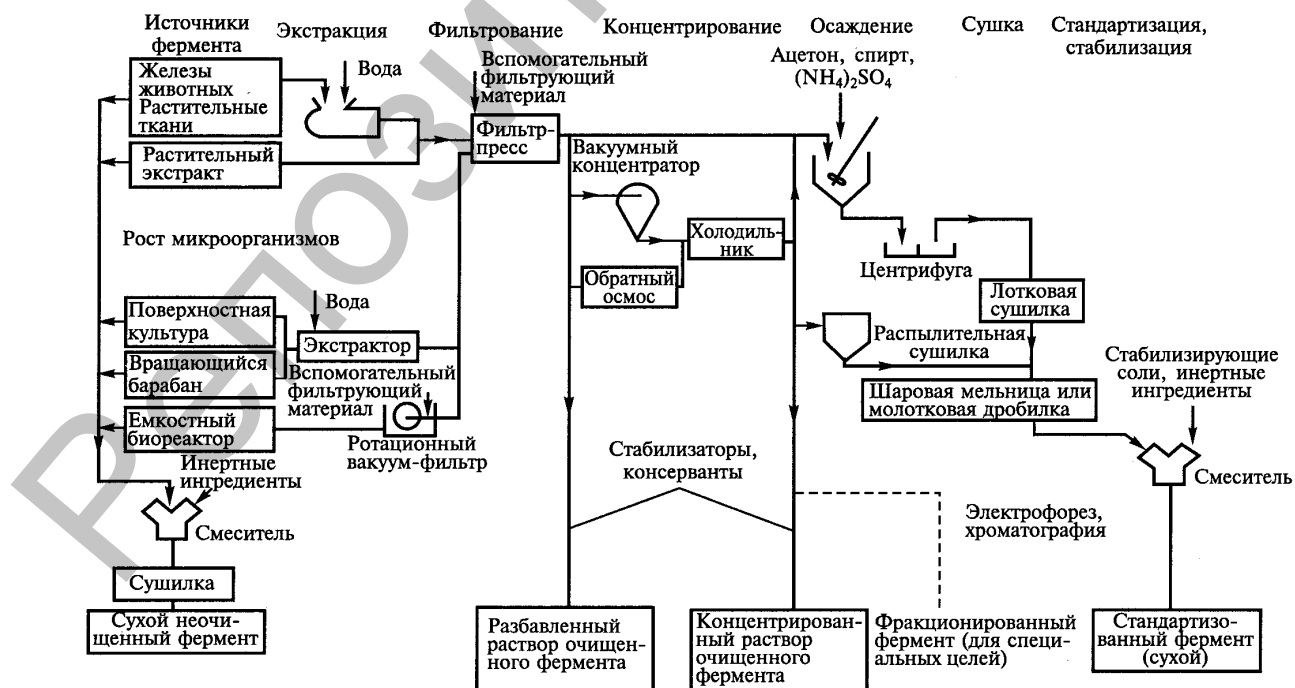


Рис. 15. Схема получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов (Егорова Т.А. и соавт., 2003).

На рисунке 16 представлено получение частично очищенного препарата бета-галактозидазы из мутанта *E.coli*.

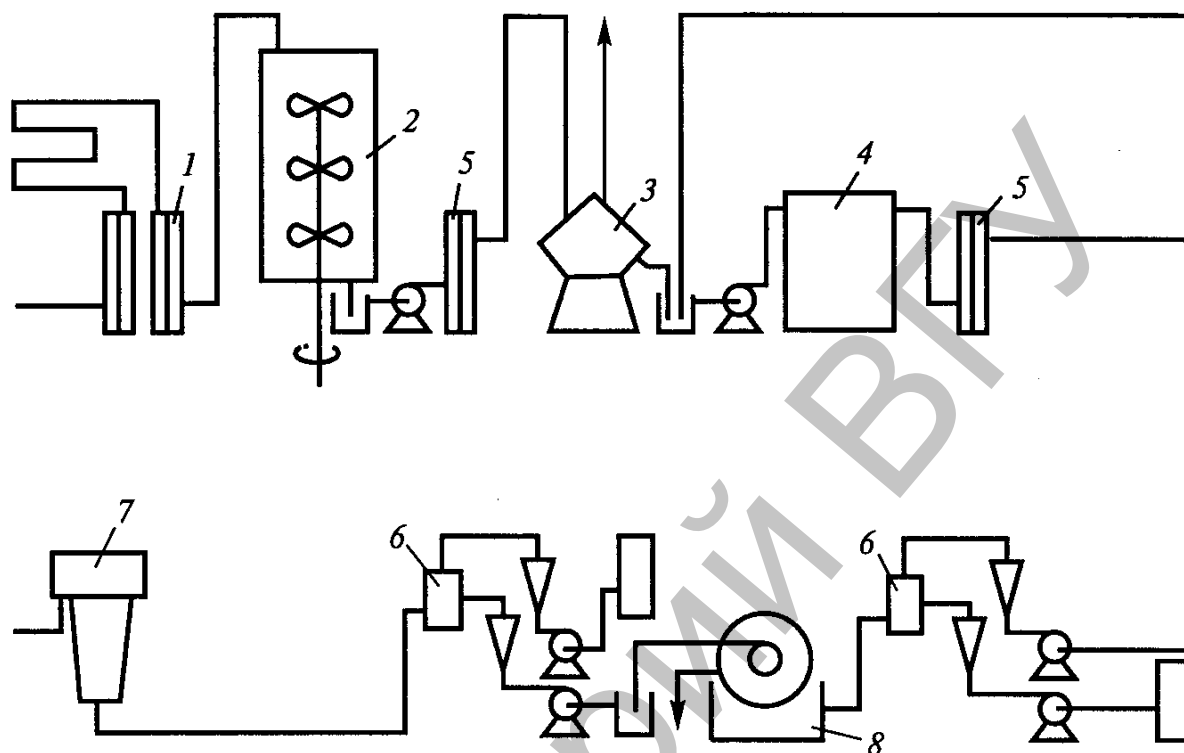


Рис. 16. Технологическая схема непрерывного получения бета-галактозидазы (Егорова Т.А. и соавт., 2003): 1 – стерилизатор среды; 2 – ферментер; 3,7 – центрифуги; 4 – гомогенизатор; 5 – теплообменник; 6 – смесительные камеры; 8 – ротационный вакуум-фильтр.

Схема очистки включает отделение клеток микроорганизма по выходе их из ферментера от культуральной жидкости посредством центрифугирования и последующее разрушение клеток в гомогенизаторе высокого давления. Для освобождения белков от нуклеиновых кислот полученный гомогенат обрабатывают сульфатом марганца до конечной концентрации этой соли в смеси, равной 0,05 М. Осадок нуклеиновых кислот отделяется с помощью ротационной вакуум-фильтрации, а в образовавшийся фильтрат добавляют сульфат аммония до 45% от его насыщения. Возникший осадок белков, содержащий бета-галактозидазу, собирают с помощью центрифугирования или вакуум-фильтрации. Вся процедура очистки фермента от начала подачи бактерий в систему до момента получения осадка бета-галактозидазы занимает всего 60 мин.

Технологии рекомбинантных ДНК наиболее успешно используются для направленной модификации микробиологических систем, используемых для получения «коммерческих» продуктов». Такие микробиологические системы производят белковые препараты, различные низкомолекулярные биорегуляторы и биополимеры.

В настоящее время созданы рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать L-аскорбиновую кислоту (одно из первых

исследований 1985 года), краситель индиго, аминокислоты, антибиотики, мономерные единицы различных биополимеров. Этот подход может превратить бактерии не только в «фабрики» по производству белков с заданными свойствами, но и низкомолекулярных веществ с необычными (не токсичными для данного микроорганизма-производителя) свойствами. Например, весьма востребован каучук, получаемый из особых растений. Его биосинтез начинается с превращения простых сахаров и включает 17 ферментативных реакций. В ходе последней из них происходит полимеризация аллилпирофосфатных остатков с образованием цис-1,4-полиизопрена. Для получения рекомбинантных микроорганизмов, производящих каучук было проведено:

- с помощью мРНК из растения *Hevea brasiliensis*, синтезирующего каучук, была создана библиотека кДНК;
- произведена гибридизация ДНК-зондом, соответствующим по нуклеотидной последовательности гену полимеразы каучука;
- полученный клон кДНК (или несколько клонов, кодирующих несколько ферментов пути синтеза каучука) можно ввести в бактериальные клетки;
- продуктом экспрессии таких рекомбинантных клеток будет биополимер - каучук.

Вариантом использования кДНК, кодирующей ферменты синтеза каучука, может быть ферментативная биосинтетическая технология *in vitro*.

Молекулярная биотехнология и питание. Человечество на протяжении тысячелетий применяет микробиологические процессы при изготовлении продуктов питания:

- за 1000 лет до н.э. технологии пивоварения, виноделия, хлебопечения приобрели черты, которые сохранились по сегодняшний день;
- за несколько столетий до н.э. среди жителей Европы и Азии распространились технологии сыроварения;
- микроорганизмы использовали народы Древнего Востока, подвергая крахмалосодержащие продукты воздействию микроскопических грибов;
- аборигены Мексики издавна заворачивают мясо перед варкой или жарением в листья дынного дерева (под воздействием протеолитического фермента папаина мясо становится более мягким).

Получение пищевого белка. При умеренной физической нагрузке взрослому человеку необходимо с пищей ежедневно получать по 3000 кал (12,5 кДж). Кроме энергетической ценности пищи важное значение имеет ее биологическая ценность, которая определяется:

- наличием незаменимых аминокислот в пищевых белках (в растительных белках отсутствует триптофан), в сутки из 100 г потребленного белка 50 г должно приходиться на белки животного происхождения;
- наличием полиненасыщенных жирных кислот в пищевых маслах (в организме человека синтезируются только жирные кислоты с одной двойной связью, в связи с этим линолевая и линоленовая жирные кислоты являются

незаменимыми компонентами пищи); в сутки из 100 г масел, 25 г должно приходиться на растительные жидкие масла;

- наличием клетчатки (из 400 г углеводов 30 г должно приходиться на клетчатку, которая необходима для перистальтики кишечника);

- наличием витаминов и макро- и микроэлементов.

К настоящему времени по самым скромным подсчетам на нашей планете существует дефицит пищевого белка примерно 15 млн. т в год. По данным А.С.Рогова и И.А.Дубровина (Московский государственный университет прикладных биотехнологий) в 2001 г. производство мяса и мясопродуктов в России на душу населения снизилось до 27 кг, а потребление на душу населения уже в 1,9 раза ниже научно обоснованных норм (78 кг). Одним из источников пищевого белка может стать биотехнологическая переработка вегетативных тел высших грибов, а также биомассы микромицетов и водорослей.

Схема биоконверсии растительного сырья в кормовые и пищевые продукты (по Кислухиной О.В., 2002). Процессы биоконверсии осуществляются по различным биотехнологическим схемам (рис. 17).

В процессах биоконверсии используют необработанное растительное сырье («прямая» биоконверсия), или сырье, подвергнутое предварительной обработке механическими, химическими, электрохимическими, радиационными методами, а также с помощью ферментных препаратов. Прямая биоконверсия целесообразна при переработке жидких субстратов с достаточно высоким содержанием легкоусвояемых соединений углерода и азота. При переработке твердых субстратов прямую биоконверсию применяют при наличии микроорганизмов с мощными ферментативными системами, способными воздействовать на биополимеры сырья, прежде всего, на структурные биополимеры.

Микробиологическую биоконверсию растительного сырья осуществляют путем глубокой, твердофазной или ферментации смешанного типа. Выбор способа культивирования зависит от вида сырья и физиологических особенностей микроорганизма, используемого при биоконверсии. Двухступенчатую ферментацию смешанного типа применяют при необходимости двухстадийной биоконверсии сырья различными штаммами микроорганизмов. Такая ферментация проводится, например, при биологической детоксикации кормов с высоким содержанием афлатоксинов.

Среди продуктов биоконверсии растительного сырья можно выделить следующие группы: корма с повышенным содержанием легкоусвояемых веществ, протеинизированные корма (корма с повышенным содержанием белка), белковые пищевые продукты и обезвреженные корма.

Высшие грибы. Одним из направлений современной биотехнологии является искусственное выращивание грибов: шампиньон двуспоровый (*Agaricus bisporum*), вешенка (*Pleurotus ostreatus*), шиитаке (*Lentinus edodes*).

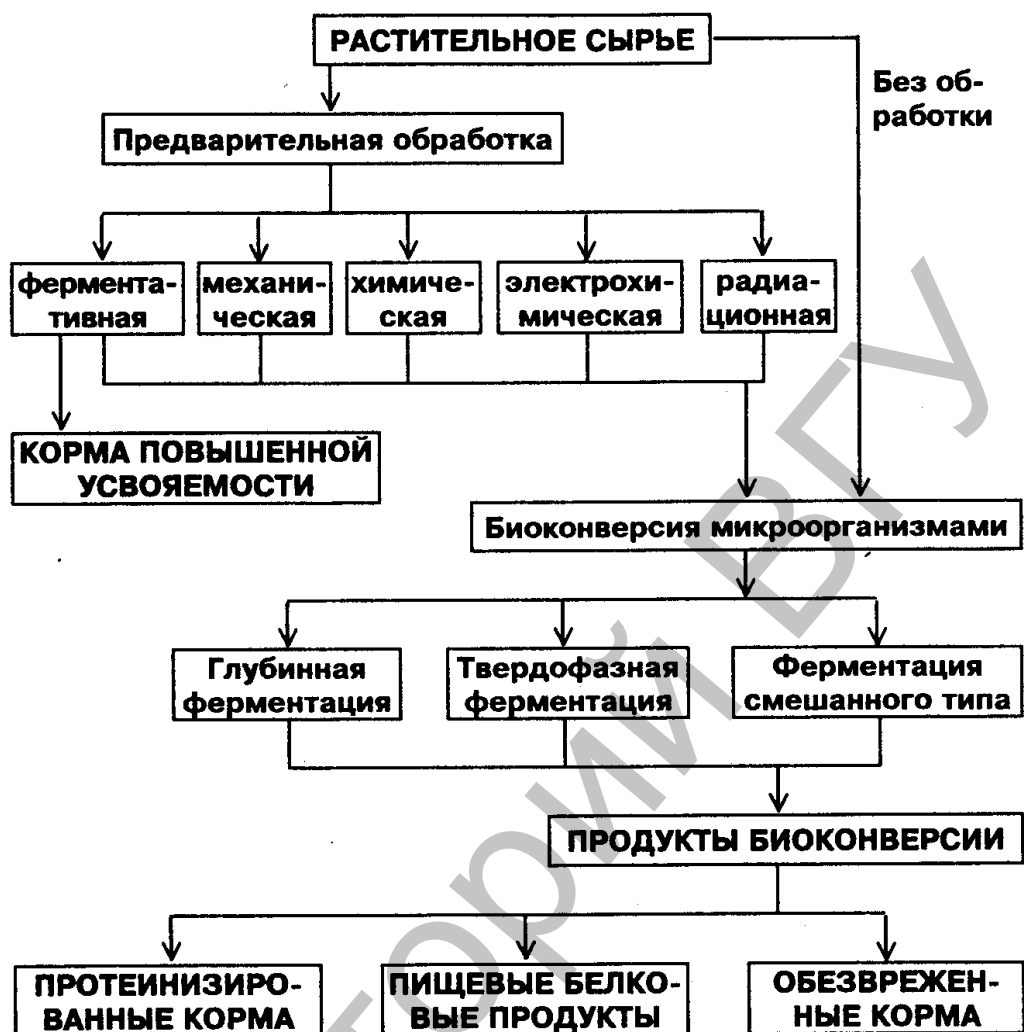


Рис. 17. Схема биоконверсии растительного сырья.

Вегетативное тело высших грибов (мицелий, грибница) по своим вкусовым и питательным свойствам аналогично плодовым телам гриба. К сожалению, выращивание мицелия высших грибов оказалось весьма трудным делом: необходима питательная среда сложного состава, включающая пектины, пептиды, аминокислоты (аргинин, глутамат, аспарагин, метионин и др.), витамины (биотин, фолиевую кислоту, рибофлавин и др.), сахара, комплекс минеральных элементов. Кроме того, чтобы мицелий имел пищевую ценность и свойства грибного деликатеса, он должен иметь вкус и аромат грибов.

Съедобные грибы являются строго сапрофитными организмами. В ходе эволюции грибы сформировали сложные симбиотические взаимоотношения с другими обитателями почвы – микроорганизмами и растениями. С середины 50-х годов 20 века были начаты эксперименты по выращиванию мицелия высших грибов в биореакторе подобно тому, как удалось в промышленных условиях выращивать мицелий микромицетов.

Установлено, что аромат и вкус каждого вида обусловлен особым комплексом ароматических веществ, которые грибы в естественных условиях получают либо в чистом виде, либо в виде предшественников из окружающей среды (гумуса почвы), или при помощи симбионтов.

Ароматизация мицелия и придание ему высоких вкусовых свойств оказалось трудной задачей. Еще не установлены все вещества, определяющие органолептические свойства грибов, поэтому ароматизацию мицелия грибов осуществляют эмпирически, путем добавления в питательный субстрат экстрактов корней деревьев, молока, ферментативных лизатов дрожжей, отвара тыквы, экстрактов пшеничных ростков, сафлорового масла, высших спиртов и др.

Питательную ценность имеет только мицелий истинных съедобных грибов – макромицетов (белый гриб, лисички и др.), в составе которых отсутствуют токсичные вещества. Мицелий условно съедобных грибов (сморчки, строчки, рыжики и др.), плодовые тела которых перед употреблением следует тщательно варить, для пищевых или кормовых целей непригоден.

Несмотря на существенные трудности, эксперименты по выращиванию макромицетов в биореакторе продолжаются. Так, например, удалось вырастить мицелий трутовика (*Polyporus squamosus*) на мелассной среде и за сутки культивирования получить в пересчете на сухой вес 18-20 г мицелия на 1 л среды. Предполагают, что выращивание мицелия макромицетов может решить проблему белка в масштабах всей планеты.

Микромицеты в питании человека. Мицелий микромицетов давно используется в питании человека. В пище жителей Азии и Дальнего Востока преобладает крахмал и не хватает белков. Для обогащения крахмалсодержащих продуктов белками и придания им вкуса мяса в этих странах с давних времен на растительных продуктах выращивают специально подобранные и естественным путем селекционированные виды плесневых грибов:

- продукт «темпе» индонезийской кухни – это арахисовые или соевые лепешки, обросшие плесневыми грибами рода *Rhizopus* (содержит 40% белка и по вкусу напоминает мясо);

- продукт «нате» японской кухни получают из соевых бобов, обросших плесневым грибом *Aspergillus oryzae* (характерен своеобразный острый вкус);

- продукт «суфу» (красный творог) китайской кухни получают из соевых бобов и некоторых видов плесневых грибов рода *Mucor*;

- соевый соус восточной кухни готовят с использованием особых штаммов плесневого гриба *Aspergillus oryzae*, бактерий *Pedicoccus soyaе*, дрожжей *Saccharomyces rouxii*, и некоторых видов дрожжей рода *Torulopsis*.

Микромицеты могут использоваться в качестве источника пищевого белка в промышленности и в домашних условиях.

Съедобные водоросли. Водоросли являются продуктом питания народов побережий:

- жители Гавайских островов из 115 видов водорослей, обитающих в окружающем океане, используют в питании 60 видов;

- в Китае ценятся сине-зеленые водоросли *Nostoc pruniforme*, по внешнему виду напоминающие сливу;

- в кулинарных справочниках Японии водоросли упоминаются в 300 рецептурах.

Естественные запасы водорослей истощаются., в связи с чем в биотехнологии бурно развивается новая отрасль – выращивание аквакультур.

В последнее время специалистов, занимающихся вопросами питания, привлекает синезеленая водоросль спирулина (*Spirulina plantensis* и *Spirulina maxima*), растущая в Африке (озеро Чад) и в Мексике (озеро Тескоко). Для местных жителей спирулина является одним из основных продуктов питания, так как содержит много белка, витаминов (особенно группы В). Биомасса спирулины приравнивается к лучшим стандартам пищевого белка. Спирулину культивируют в открытых прудах (например, в Сочи) или в замкнутых системах из полиэтиленовых труб. В процессе культивирования удается собирать до 20 г биомассы в пересчете на сухое вещество с 1 м³ в сутки.

Дрожжи.. Биомассу дрожжей, как источник пищевого белка, используют в экстремальных условиях (голод, сухие пайки путешественников), т.к. дрожжи обладают толстой клеточной оболочкой. В биотехнологии используют выращивание богатой белками биомассы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на простых синтетических средах (например, на этиловом спирте, в качестве стимуляторов роста предложено использовать гуминовые кислоты торфа). Разработаны способы выделения из дрожжевой биомассы очищенных белковых концентратов. При выращивании хлебопекарных дрожжей на синтетической этанольной среде в лабораторном ферментере при непрерывном режиме с добавкой 0,5% дрожжевого экстракта достигнута концентрация биомассы в пересчете на сухой вес 8-9 г/л использованного субстрата. Вместо дрожжевого экстракта можно применять кукурузный экстракт или депротеинизированный сок картофеля. Разработаны технологии обогащения продуктов питания очищенными белковыми концентратами дрожжей.

Получение аминокислот. По содержанию лизина наименее сбалансированы белки злаковых культур, у которых его дефицит составляет от 20 до 50%. В странах СНГ недостаток лизина в кормах не может быть восполнен за счет сои, поэтому производство этой аминокислоты было организовано первым. В клетках микроорганизмов лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты и служит конечным продуктом разветвленного метаболического пути биосинтеза, общего для трех аминокислот – лизина, метионина и треонина. Образование лизина в клетке бактерии находится под строгим метаболическим контролем. У типичных продуцентов L-лизина – *Brevibacterium flavum*, и *Corynebacterium glutamicum* – фермент аспартаткиназа, открывающий метаболический путь, является аллостерическим белком, способным ингибироваться треонином и метионином. Чтобы добиться образования лизина в больших количествах, получают мутанты, которые способны синтезировать лизин в присутствии ингибирующих концентраций треонина и метионина.

Для выхода синтезированного лизина из микробных клеток используют изменение проницаемости клеточных мембран. Для этого применяют специальные мутантные штаммы микробов. Но чаще проницаемость мембраны увеличивают путем изменения состава питательной среды: в культуральной среде создают дефицит биотина (1-5 мкг/л), добавляют пенициллин (2-4 мкг/л), детергенты (твин-40 и твин-60) или производные высших жирных кислот (пальмитаты, стеараты). Биотин контролирует содержание в клеточной мембране ряда фосфолипидов, пенициллин нарушает биосинтез биополимеров клеточных стенок бактерий, что повышает выделение аминокислот в среду. Технологическая схема получения препаратов лизина из свекловичной мелассы представлена на рисунке 18.

Производство лимитирующих аминокислот представляет собой крупнотоннажную специализированную отрасль. Ежегодно в мире производится более 800000 т аминокислот стоимостью более 5 млрд. долларов. Более 98% производства приходится на глютаминовую кислоту, метионин, лизин и триптофан. Основными способами получения аминокислот являются методы микробиологического (лизин, треонин, валин) и химического (метионин, триптофан, фенилаланин) синтеза. Часть дефицитных аминокислот получают с помощью ферментативных методов (метионин), экстракцией (цистин, тирозин) и генной инженерии (лизин, треонин). В Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова предложена технология получения глутамата натрия из отходов пивоваренного производства, используемых в качестве субстрата для промышленных штаммов *Corinebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* (создана модель безотходного производства).

Получены положительные результаты в увеличении выхода триптофана, синтезированного *C.glutamicum*. Для этого в клетки *C.glutamicum* дикого типа была введена вторая копия гена, кодирующего антранилатсинтазу, фермент, лимитирующий синтез триптофана.

Следует помнить, что применение аминокислот должно строго контролироваться, поскольку возможны негативные эффекты их применения с образованием токсичных продуктов дезаминирования триптофана, тирозина, гистидина.

БВК – микробиологический белок для кормления животных. В странах СНГ свыше 1 млн. т/год, т.е. 60% продукции, выпускалось на основе парафинов нефти, а 40% - на основе гидролизатов древесины. Организация производства белка осуществлялась и с использованием спирта и природного газа. Разработана технология с использованием в качестве сырья зерно-мукомольных отходов, их последующего гидролиза и выращивания на этой питательной среде кормового микробиологического белка с помощью специально подобранных высокоэффективных штаммов микроорганизмов. В результате получается биомасса, содержащая 45-55% протеина в готовом продукте (ФГУП ГосНИИсинтезбелок).

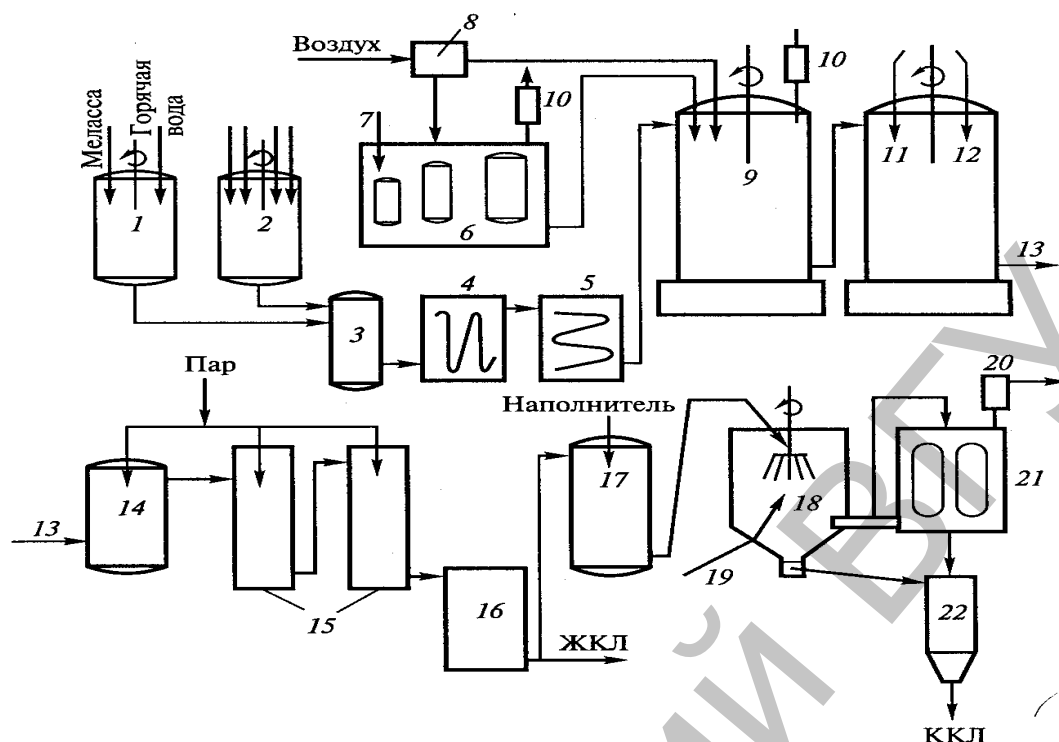


Рис. 18. Технологическая схема получения кормовых препаратов лизина (Егорова Т.А. и соавт., 2003): 1 – подача свекловичной мелассы; 2 – водная суспензия кукурузного экстракта и питательных солей; 3 – нагревательная колонка; 4, 5 – теплообменники; 6 – посевные аппараты; 7 – подача посевного материала; 8 – система фильтров для очистки и стерилизации воздуха; 9 – ферментер; 10 – фильтры для очистки отходящих газов; 11 – получение монохлоргидрата лизина; 12 – подача соляной кислоты; 13, 14 – выход и подогрев монохлоргидрата лизина; 15 – выпаривательная установка; 16 – сборник жидкого концентрата лизина; 17 – смешивание жидкого концентрата лизина с наполнителем; 18 – распылитель; 19 – подача горячего воздуха; 20 – очиститель воздуха; 21 – отделение сухого препарата лизина от воздуха; приемник кормового концентрата лизина.

Разработана аналогичная технология с использованием шрота хлопчатника. Такие технологические процессы экономически выгодны при отсутствии соевого белка для кормления животных. По содержанию незаменимых аминокислот и витаминов дрожжевая масса не уступает, а иногда превосходит соевые белки. Добавка БВК в корма экономит фуражное зерно (5 т на 1 т БВК) и увеличивает привесы животных.

Новые формы белковой пищи – это продукты питания, полученные на основе различных белковых фракций продовольственного сырья с применением научно обоснованных способов переработки и имеющие определенный химический состав, структуру и свойства, включая биологическую ценность. Традиционными источниками для производства белковых продуктов являются соя и пшеница. Если вспомнить историю, то в России были времена так называемого «царя гороха», т.е. времена, когда на

столе русских царствовал горох – представитель семейства бобовых, к которым относится и соя. В 2000 г. на Украине произведено около 55 тыс. т. сои. Показано, что потребление 25 г соевого белка в день на 30% снижает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Соевые белки содержат меньше метионина, цистеина и лизина, чем животные, но они не обладают гиперлипидемическим действием. Продукты из соевых белков подразделяются на три группы, отличающиеся по содержанию белка: мука-крупа, концентраты и изоляты. Соевая мука и крупа производятся на мельничном оборудовании путем измельчения до определенного размера частиц обезжиренных или необезжиренных семян с последующим их просеиванием. В муке и крупе содержится 40-54% ($N \times 6,25$) белка от общей массы продукта. Соевые белковые концентраты изготавливаются из очищенных и обезжиренных соевых бобов (белых лепестков) путем удаления растворимых в воде небелковых компонентов (олигосахаридов, минеральных веществ, органических кислот). Концентраты содержат 65-70% белка на сухое вещество. Соевые белки изоляты являются наиболее очищенной формой белковых продуктов, т.к. содержат не менее 90% белка на сухое вещество.

Назначение текстурированных белковых продуктов заключается в придании пищевым изделиям волокнистой или многослойной (кускообразной) структуры. После гидратации такие белковые продукты по внешнему виду и структуре напоминают мясо, птицу или морские продукты, выступая при этом в роли аналогов традиционных пищевых продуктов. Многослойная мясоподобная структура соевых белковых продуктов может формироваться с помощью термопластической экструзии. Основные стадии процесса включают: дозирование сырья → кондиционирование (увлажнение, нагревание) → формирование волокон → разрезание продукта на куски → сушка. В основе экструзии лежит процесс реструктуризации белка, заключающийся в том, что под влиянием температуры, увлажнения и механического воздействия макромолекулы его формируют вязкопластическую массу, выстраивающуюся в направлении сдвига, с образованием новых поперечных связей. В результате образуется многослойная объемная жевательная структура, пригодная для использования в качестве наполнителей или аналогов.

Модифицированные белки (частично или полностью гидролизированные) получают из белковых продуктов с применением протеолитических ферментных препаратов или кислотного гидролиза. Такие белки используются как функциональные и вкусовые добавки к пище.

Ферментные препараты в отличие от ферментов содержат помимо активного фермента множество балластных веществ, в том числе и других белков. В пищевой промышленности используются ферментные препараты из гепатопанкреаса гидробионотов (например, камчатского краба), содержащие коллагеназу. Обработка таким препаратом мяса за счет гидролиза коллагена уменьшает напряжение среза на 20% и работу резания на 50%. Кроме того, большинство ферментных препаратов являются

комплексными, т.е. кроме основного фермента, содержащего наибольшую активность, в его состав входят другие сопутствующие ферменты. Однако существуют препараты и индивидуальных ферментов. Название ферментного препарата включает название основного фермента и название микроорганизма-продуцента, с окончанием «-ин». Например: амилоризин – основной фермент – амилаза, продуцент *Aspergillus oryzae*; протосубтилин – основной фермент – протеаза, продуцент *Bacillus subtilis*. Помимо этого, в названии обязательно отражается способ культивирования микроорганизма: Г – глубинное, П – поверхностное, а также степень очистки – X (2X, 3X, 10X, 15X, 20X).

Ферментные препараты должны проходить тщательный химический, микробиологический и токсикологический контроль для обеспечения их безопасного применения. Особое место занимают ферментные препараты, получаемые из генетически модифицированных микроорганизмов. Основными ферментными препаратами, полученными методами генетической инженерии и разрешенными к применению в пищевой промышленности, являются α -амилаза из *B. stearothermophilus*, экспрессированная в *B. subtilis*; α -амилаза из *B. megaterium*, экспрессированная в *B. subtilis*; химозин А, полученный из штамма *E. coli* K-12, содержащего ген телячьего прохимозина А.

Обогащение белков лимитирующими аминокислотами.

Зависимость функционирования организма от количества незаменимых аминокислот используется при определении биологической ценности белков химическими методами. Наиболее широко используется метод Х.Митчела и Р.Блока, в соответствии с которым рассчитывается показатель *аминокислотного сора (а.с.)*.

Таблица 8

Рекомендуемые составы и суточная потребность человека в незаменимых аминокислотах, мг/г белка (по А.П.Нечаеву, 2003)

Наименование Аминокислоты	ФАО/ВОЗ, 1985 г.			ФАО/ВОЗ, 1973 г., взрослые	Мг/кг массы тела
	Дети, 2- 5 лет	Дети, 10-12 лет	Подростки		
Изолейцин	28	28	13	40	10
Лейцин	66	44	19	70	14
Лизин	58	44	16	55	12
Метионин+цистин	25	22	17	35	13
Фенилаланин+тирозин	63	22	19	60	14
Треонин	34	28	9	40	7
Валин	35	25	13	50	10
Триптофан	11	9	5	10	3,5

Аминокислота, скор которой имеет самое низкое значение, называется первой лимитирующей аминокислотой. Значение сора этой аминокислоты определяет биологическую ценность и степень усвоения белков.

Скор выражают в процентах или безразмерной величиной, представляющей собой отношение содержания незаменимой аминокислоты (а.к.) в исследуемом белке к ее количеству в эталонном белке:

$$\text{Аминокислотный скор} = (\text{мг а.к. в 1 г белка} / \text{мг а.к. в 1 г эталона}) \times 100$$

Аминокислотный состав эталонного белка сбалансирован и идеально соответствует потребностям организма человека в каждой незаменимой аминокислоте, поэтому его называют «идеальным» (таблица 8).

Для учета всех незаменимых аминокислот определяют *индекс незаменимых аминокислот* (ИНАК), который представляет собой корень в степени, равной количеству анализируемых аминокислот (если все, то 8) из произведений отношений содержания каждой незаменимой аминокислоты в исследуемом белке к содержанию ее в эталонном белке.

Помимо химических методов используют также биологические методы (животные, микроорганизмы). Основными показателями оценки при этом являются привес (рост животных) за определенный период времени, расход белка и энергии на единицу привеса, коэффициенты перевариваемости и отложения азота в теле, доступность аминокислот. Показатель, определяемый отношением привеса животных (в г) к количеству потребляемого белка (в г) был разработан П.Осборном и носит название *коэффициент эффективности белка* (КЭБ). Для сравнения при определении показателя используют контрольную группу животных со стандартным белком – казеином, в количестве, обеспечивающем в рационе 10% белка. В опытах на крысах эффективность казеинового белка равна 2,5.

Оценивают степень усвоения белков после переваривания. Из животных белков в кишечнике всасывается более 90% аминокислот, а из растительных – только 60-80%. В порядке убывания скорости усвоения белков в пищеварительном тракте пищевые продукты располагаются в последовательности рыба > молочные продукты > мясо > хлеб > крупы.

Растительный белок зерновых и других культур уступает животному по содержанию незаменимых аминокислот (триптофан, лизин, треонин). Поэтому разрабатываются и внедряются программы питания, предусматривающие применение растительных белков и лимитирующих аминокислот. Оптимальный баланс незаменимых факторов питания обеспечивается путем правильного подбора и сочетания различных видов белков (эффект взаимного обогащения). Дополнение в пищу сои является методом восполнения недостатка лизина в пшенице, кукурузе и рисе. За счет правильного подбора составляющих в смесях из хлебных, бобовых и масличных культур можно значительно повысить КЭБ, за эталон которого принимают показатель для казеина (2,5). Смеси из хлебных культур с соевыми продуктами комплементарны по аминокислотному составу уже при соотношении 50:50, однако идеальным считают 30:70.

В зависимости от соотношения белковых составляющих различают эффекты истинного и простого обогащения. Эффект истинного обогащения наблюдается в том случае, если скор для каждой незаменимой аминокислоты в белке создаваемого продукта не менее 1,0. Эффект простого обогащения –

если значения аминокислотного сора композиции хотя и меньше 1,0, но выше, чем значения данного показателя для белков каждого продукта в отдельности. Сбалансированность аминокислотного состава в белковых продуктах положительно отражается на их усвояемости. Так, усвояемость взрослым человеком соевых белковых концентратов и изолятов составляет 91-96% (аналогичные цифры характерны для белков молока), сухой пшеничной клейковины – 91%, белковой муки из пшеничных отрубей – 94%. Этот показатель можно увеличить до 97-99% смешиванием их с лимитирующими аминокислотами. Добавление 0,5-1,5% метионина к белковым продуктам из сои приближает их по питательной ценности к идеальному белку.

Липиды из-за низкой влажности, отсутствия минеральных веществ не поражаются микроорганизмами и в темноте могут храниться относительно долго. Бактериальные технологии не получили развития применительно к пищевым жирам. Но многие виды растительного сырья являются хорошими источниками биологически активных липидов (БАЛ) – полиненасыщенных жирных кислот, токоферолов, каротиноидов. Масла из зародышей пшеницы, ржи и просяных мучелей содержат до 11% линоленовой кислоты – предшественника арахидоновой кислоты. Для масел из зародышей зерновых культур и из облепихи характерно высокое содержание токоферолов, достигающее в пшеничном масле более 1%. Плоды шиповника, аронии, красной рябины, кизильника, барбариса, жимолости, облепихи богаты каротиноидами. Масло из семян томатов содержит до 1% каротиноидов.

Технологические процессы выделения БАЛ имеют общие черты, обусловленные величиной содержания их в сырье и характером локализации. По общему содержанию липидов источники БАЛ относятся к низкомасляничным (менее 30%) видам сырья (рисунок 19).

Углеводы широко применяются в биотехнологиях производства хлебопродуктов, в бродильном производстве и др.

Итак, имеются ощутимые успехи в использовании микробиологических технологий в оптимизации питания:

- 1) борьба с дисбактериозом путем введения в продукты питания бифидобактерий, лактобактерий, пропионовых кислотных бактерий – препараты-пробиотики;
- 2) создание системы функционального питания, под которым понимают использование продуктов естественного происхождения, обладающих определенными регулирующими свойствами на организм в целом или на его отдельные системы путем обогащения пищи незаменимыми компонентами (например продукты из сои) или заменой потенциально вредных компонентов на безвредные (вместо сахарозы использование подсластителя парагвайского растения – стевия).

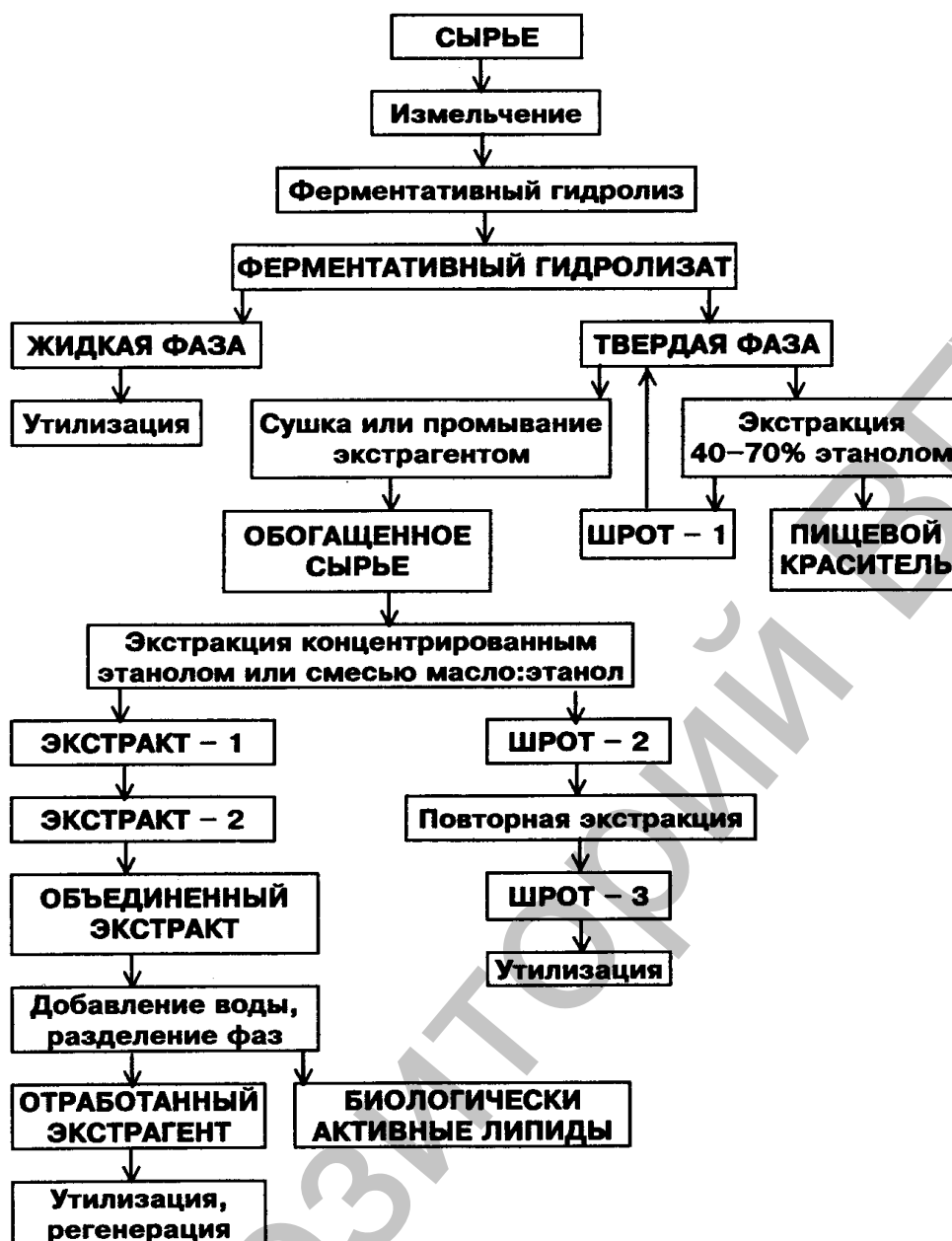


Рис. 19. Схема получения биологически активных липидов из низкомасличного сырья (Кислухина О.В., 2002).

Бродильное производство используется для получения ряда пищевых продуктов.

Использование крахмала и сахаров. Крахмал, основной резервный полисахарид растений, представляет собой смесь гомополимеров D-глюкозы – как линейных (амилоза), так и разветвленных (амилопектин). Крахмал широко используется в пищевой промышленности и пивоварении. Его сначала гидролизуют до низкомолекулярных компонентов, а затем превращают во фруктозу или этанол. Для ферментативного гидролиза крахмала необходимы α -амилаза, глюкоамилаза и глюкозоизомераза (это наиболее часто употребляемые в пищевой промышленности ферменты, на их долю приходится до 30% стоимости от всех используемых ферментов).

Основные этапы производства фруктозы и этанола из крахмала:

- Желирование молотого зерна путем его обработки паром под давлением (разрушение крахмальных зерен и доступность крахмала для гидролизующего фермента); продукт имеет желеобразную консистенцию.

- Ожижение путем охлаждения желированного крахмала до 50-60 °С и добавления α -амилазы. При такой температуре усиливается проникновение фермента в желированный крахмал и увеличивается скорость гидролиза до низкомолекулярных полисахаридов.

- Осахаривание (полный гидролиз) низкомолекулярных полисахаридов до глюкозы (фермент глюкоамилаза).

- Получение фруктозы с помощью глюкоизомеразы.

- Получение этанола с помощью дрожжевой ферментации.

Развитие этих технологий требует:

- Использования для получения необходимых ферментов быстрорастущих рекомбинантных микроорганизмов.

- Методами генетической инженерии получения более термостабильного и активного фермента α -амилазы, что необходимо для ускорения гидролиза желированного крахмала.

- Модификации генов α -амилазы и глюкоамилазы для получения ферментов с одинаковыми оптимумами pH и температуры.

- Создания гена для синтеза фермента, способного гидролизовать необработанный крахмал, исключив этап желирования.

- Создания такого микроорганизма для ферментации, который будет синтезировать глюкоамилазу в процессе гидролиза крахмала.

К настоящему времени получены следующие обнадеживающие результаты по изменению свойств ферментов методами генетической инженерии с целью их приспособления для технологических промышленных установок получения фруктозы и этанола:

- получены гены α -амилазы из различных источников, в том числе из термофильной бактерии *B. Stearothermophilus*, что позволило получать рекомбинантные образцы фермента с заданными свойствами, необходимыми для определенного технологического процесса (например, повышение оптимума температуры);

- фермент глюкоизомераза (ксилозо/глюкоизомераза) получен путем экспрессии этого гена из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* в *E. coli* и *B. brevis*, в результате чего в 1000 раз повышается производство ферментативного белка, а сам фермент сохраняет свою стабильность при 95 °С.

Для сбраживания крахмала при промышленном производстве этанола используют дрожжи *S. cerevisiae*. В тропических странах для тех же целей применяют бактерию *Zymomonas mobilis*, которая обеспечивает более высокую скорость образования этанола, но число углеродных субстратов ограничено. В связи с этим в *Zymomonas mobilis* были введены гены ферментов, способных гидролизовать лактозу, крахмал, целлюлозу, ксилозу и целлобиозу. С помощью методов генетической инженерии создан микроорганизм – продуцент этанола, который может использовать в качестве

источника углерода ксилозу, побочный продукт деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

Процессы брожения касаются ферментативных превращений углеводов. Брожение – процесс, используемый в ряде пищевых технологий: во время приготовления теста, хлеба, в производстве кваса, пива, вина, спирта и др. Спиртовое брожение осуществляется благодаря жизнедеятельности ряда микроорганизмов; чаще используются дрожжи рода *Sacharomyces*. При спиртовом брожении кроме этилового спирта в незначительном количестве образуются некоторые другие вещества, например, янтарная, лимонная кислота, смесь амилового, изоамилового, бутилового и других спиртов, уксусная кислота, дикетоны, уксусный альдегид, глицерин и другие вещества, от наличия ничтожных количеств которых зависит специфический аромат вина, пива и других спиртных напитков. Разные сахара сбраживаются дрожжами с различной скоростью. Наиболее легко подвергаются сбраживанию глюкоза и фруктоза, медленнее – манноза и галактоза; пентозы дрожжами не сбраживаются. Из дисахаридов хорошим субстратом спиртового брожения являются сахароза и мальтоза. Однако оба сахара сбраживаются лишь после предварительного гидролиза на составляющие их моносахариды ферментами α -гликозидазой и β -фруктофуранозидазой дрожжей. В присутствии кислорода спиртовое брожение прекращается и дрожжи получают энергию, необходимую для их развития и жизнедеятельности, путем кислородного дыхания. При этом дрожжи тратят сахар значительно экономнее, чем в анаэробных условиях. Прекращение брожения под влиянием кислорода называется «эффектом Пастера».

Другой вид брожения, важный для пищевых технологий, это молочнокислое брожение, при котором из одной молекулы гексозы образуются две молекулы молочной кислоты. Этот тип брожения важен в производстве молочнокислых продуктов (простокваши, кефира, кумыса), при изготовлении кваса, хлебных заквасок и «жидких дрожжей» для хлебопечения, при квашении капусты, при силосовании кормов. Все микроорганизмы, вызывающие молочнокислое брожение, делят на две группы:

- к первой группе принадлежат гомоферментативные молочнокислые бактерии микроорганизмы, подобные *Streptococcus lactis*, являющиеся истинными анаэробами;

- к второй группе относят гетероферментативные молочнокислые бактерии, которые кроме молочной кислоты образуют другие продукты (этиловый спирт, уксусную кислоту), например, *Bacterium lactis aerogenes*. Интересно, что при изготовлении ржаного хлеба (теста), наряду со спиртовым брожением, происходит молочнокислое, что ведет к накоплению молочной и уксусной кислот.

Ведутся интенсивные работы по использованию пропионовокислых бактерий, способных продуцировать витамин В₁₂ и тем самым регулировать

гемопоз, процессы биосинтеза многих низкомолекулярных биорегуляторов и ДНК.

Производство алкогольных напитков. Алкогольные напитки получают путем сбраживания сахаросодержащего сырья, в результате которого образуется спирт и углекислый газ. В одних случаях используется природный сахар (например, содержащийся в винограде, из которого делают вино), в других сахара получают из крахмала (например, при переработке зерновых культур в пивоварении). Наличие свободных сахаров обязательно для спиртового брожения при участии *Saccharomyces*, так как эти виды дрожжей не могут гидролизовать полисахариды. В отечественном производстве спиртных напитков применяют штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* или *Saccharomyces carlsbergensis* (вторые могут полностью сбраживать раффинозу, а первые нет).

Основными видами сырья для производства этанола являются картофель и рожь в Европе, картофель и пшеница в России и Беларуси, кукуруза и рожь в США, рис и бататы на Востоке, тапиока в тропических странах. В пивоварении издавна применяется зерновой солод. В словаре В. Даля написано «Солод хлебное зерно, теплом и мокротою пущенное в рост, засушенное и крупно смолотое; проросший хлеб, в котором образуется сахарное начало, сладимый вкус». Солод используется как источник амилолитических ферментов и выполняет три функции: 1) обеспечивает достаточно глубокое осахаривание и выбраживание только за трое суток; 2) является источником легкоусвояемого азотистого питания для дрожжей (в процессе солодоращения из-за повышения активности протеиназ в 40 раз накапливаются аминокислоты до 32% от общего азота); 3) приводит к гидролизу клеточных стенок растительного сырья за счет цитолитической активности, что улучшает контакт крахмала с амилолитическими ферментами. Скорость осахаривания крахмала при использовании солода остается достаточно низкой, что затрудняет интенсификацию процесса брожения. Этот процесс ускоряют путем добавления ферментных препаратов микробного происхождения.

Приготовление пива требует следующих условий.

1. Традиционным источником углеводов является ячмень (иногда с добавками других видов углеводов-содержащего сырья).
2. Ячменный солод и прочие компоненты измельчают и смешивают с водой при температуре до 67 °С. В ходе перемешивания природные ферменты ячменного солода разрушают углеводы зерна.
3. Раствор, называемый суслом, отделяют от нерастворимых остатков, добавляют хмель и кипятят в медных котлах.
4. Для производства пива с определенным содержанием алкоголя сусло после кипячения доводят до нужной плотности. Удельная плотность сусла определяется содержанием экстрагированных сахаров, подлежащих сбраживанию. Добавляют дрожжи.

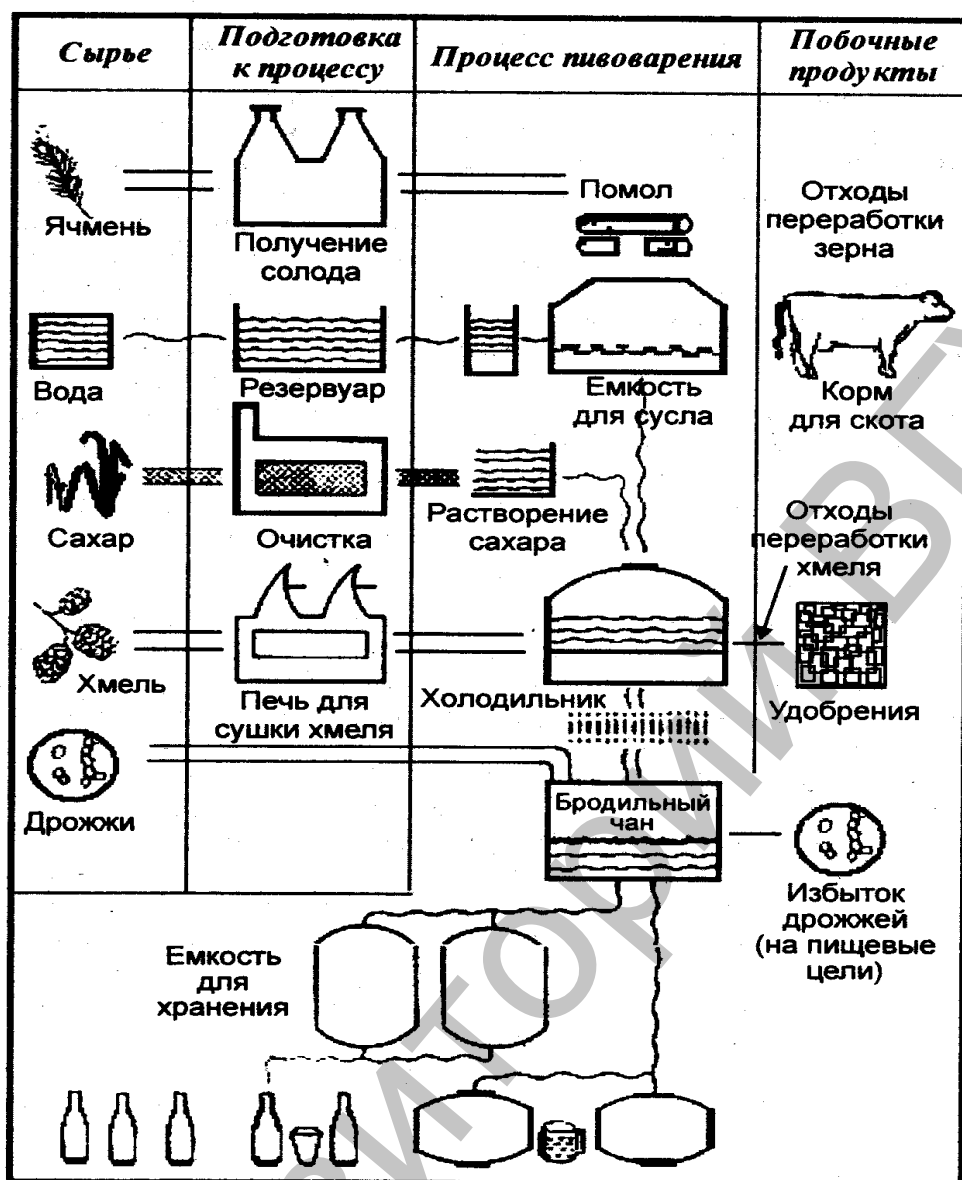


Рис. 20. Процессы, используемые в пивоварении (Голубев В.Н., Жиганов И.Н., 2001).

Saccharomyces cerevisiae представляют собой дрожжи поверхностного и глубинного брожения, они применяются в производстве эля. *Saccharomyces carlsbergensis* – дрожжи глубинного брожения, их используют в производстве легкого пива.

5. По истечении определенного времени брожение заканчивается, дрожжи отделяют от пива и выдерживают некоторое время для созревания.

6. После фильтрации и других необходимых процедур пиво готово.

Каждый из перечисленных процессов должен пройти с определенной глубиной, чтобы обеспечить нормальное протекание фильтрации затора, брожения сусла, осветление и фильтрацию пива, а также создание определенных физико-химических свойств (пенообразование, прозрачность, стойкость при хранении) и вкусовых качеств готового продукта (рисунок 20). Применение ферментных препаратов микробного происхождения (амилоризин ПХ, П10Х, амилосубтилин Г10Х, Г20Х, протосубтилин Г10Х,

цитороземин ПХ) с целью замены солода несоложенным ячменем позволяет интенсифицировать процесс, избежать потерь ценных компонентов сырья на дыхание и образование проростка.

При хранении бутылочного пива за счет роста микроорганизмов может возникать *холодная муть*. Такое биологическое помутнение предотвращается пастеризацией пива или стерильной фильтрацией при заполнении бутылок в асептических условиях. Небиологическое помутнение пива может происходить при его продолжительном хранении; этот процесс ускоряется при действии света, тепла, кислорода, в присутствии следов железа или меди, а также при одновременном воздействии этих факторов. Состав мути зависит от преобладающего действия того или иного из этих факторов. Основными составляющими холодной мути являются: белки (40-76%), танин (17-55%), углеводы (3-13%). Холодная муть состоит из очень тонкого осадка, который образуется при выдержке пива при температуре ниже 10 °С. Для борьбы с холодной мутью используют растительные ферменты (папаин, фицин, бромелаин), грибковые (продуцируемые микроскопическими грибами рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Amylomyces*) и бактериальные (*B. subtilis*) протеазы. Наиболее широко для этой цели используют папаин или его комплексов с другими ферментными препаратами. Это связано с относительной термостабильностью папаина и его устойчивостью к пастеризации.

В производстве *вина* используется сахар виноградного сока. Почти все вино в мире делают из винограда одного вида – *Vitis vinifera*. Сок этого винограда – прекрасное сырье для производства вина. Он богат питательными веществами, служит источником образования приятных запаха и вкуса, содержит много сахара; его природная кислотность подавляет рост нежелательных микроорганизмов.

Виноделие в отличие от пивоварения до последнего времени было основано на использовании местных дрожжей дикого типа. Единственная обработка, которой подвергали виноград до отжима, - окуривание сернистым газом, чтобы сок не темнел. Кроме того, сернистый газ подавляет деятельность не винных дрожжей. Это позволяет винным дрожжам осуществлять брожение без помех. При изготовлении красного вина гребни, косточки и кожица до конца брожения находятся в виноградном сусле (мусте), а белое вино делают из чистого сока. Обычно окуривание сернистым газом проводят до того, как раздавливают ягоды, но иногда его применяют и на более поздних стадиях. В настоящее время широко применяются дрожжевые закваски: инокуляция стандартной культурой дрожжей позволяет получать вина с нужными свойствами. Количество используемого сернистого газа ограничено законом, и это побуждает применять дрожжевые культуры-закваски. Использование заквасок имеет ряд преимуществ:

- сокращается лаг-период размножения дрожжей;
- образуется продукт с известными свойствами;
- уменьшается вероятность появления нежелательного вкуса, поскольку в брожении не участвуют дикие дрожжи;

- смешанные закваски позволяют получать продукцию с полным букетом.

Вкусовые различия между сортами винограда определяются особыми веществами. Так, в формировании вкуса мускатных сортов участвуют производные терпенов, линалоол и гераниол. Различные вкусовые оттенки появляются при выдержке вина. Контакт с древесиной (бочки) вносит свой вклад в формирование вкуса вина. После завершения спиртового брожения молодое вино хранят в особых условиях, чтобы оно не испортилось. Если вино не предполагается подвергать яблочно-молочнокислородному дображиванию, его обрабатывают сернистым газом, что подавляет окислительные процессы, вызывающие его потемнение. До этого из вина удаляют дрожжи, чтобы прекратить брожение.

Первосортные вина подвергают выдержке различных периодов, дешевые вина разливают в год их получения. В дешевых винах стараются подавить вторичное яблочно-молочнокислородное брожение до разлива. При производстве первосортных красных вин этот тип брожения желателен и вызывается молочнокислыми бактериями (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*). Такое брожение не происходит при низких значениях pH. В белых винах яблочно-молочнокислородное брожение происходит реже из-за более низких значений pH. В виноделии для инициации брожения в последние годы все чаще используют иммобилизованные ферменты вместо бактерий.

Некоторые особые сорта вин, например сотерны, получают при участии гриба *Botrytis cinerea*. Его развитие на ягодах приводит к их обезвоживанию и повышению содержания сахара, что и определяет сладкий вкус вина. Заражение должно происходить только перед сбором винограда.

Углекислотную мацерацию применяют при получении вин, которые должны созреть к 15 ноября в год сбора винограда. В данном случае виноград не давят, а помещают целиком в бродильные чаны, где держат в атмосфере углекислого газа. Брожение идет либо прямо в ягодах в анаэробных условиях, либо в соке, выделившемся в результате разрушения кожицы углекислым газом.

В крепленых винах часть спирта получается при сбраживании винограда дрожжами, а часть добавляется (портвейн, херес и мадера).

Для получения напитка, содержащего 40% (по объему) спирта, нужна перегонка. Ее осуществляют в перегонных аппаратах (созданы Коффи в 1830 г.). Некоторые сорта спирта обычно производят из вполне определенных типов сырья. Так, коньяк, получаемый при перегонке вина, делают из винограда, а шотландский виски – из ячменного солода. Другие напитки – американский виски, джин и водку получают из кукурузы или других зерен. Ром обычно получают из мелассы сахарного тростника или свеклы. Когда сырьем служит зерно (пшеничное, кукурузное), до сбраживания необходимо гидролизовать крахмал до сахаров. Так, виски – это продукт перегонки пива без хмеля. Первые стадии процесса производства виски такие же, что и при приготовлении сусла в пивоварении. Однако, если применяют кукурузу или другие зерновые, то до приготовления сусла непосредственно в бродильных

чанах проводят обработку крахмала в зерне ферментами солода. Расширяется применение амилазы из культуральной жидкости штаммов *Bacillus subtilis* и амилогликозидазу, выделенную из культур грибов штаммов *Aspergillus niger* и близких форм. После подготовки сырья добавляют культуру подходящих дрожжей и ведут сбраживание. В самом конце, когда концентрация спирта достигнет 9-11% (по объему), дрожжи отделяют путем отстаивания. Остатки их можно удалить центрифугированием.

Штаммы дрожжей, используемые в спиртовой промышленности, должны сохранять жизнеспособность вплоть до концентрации этанола 12-15% (по объему). Кроме того, если в качестве сырья используется зерно, дрожжи должны обладать способностью гидролизовать олигосахариды до глюкозы. Это необходимо для полного превращения крахмала в этиловый спирт и углекислый газ.

Перегонка – дорогостоящий этап процесса, т.к. он энергоемок. Использование дрожжей, выдерживающих повышенные концентрации спирта, уменьшает энергозатраты на этом этапе, поскольку для достижения одной и той же концентрации спирта надо отгонять меньше воды. В связи с этим ведутся работы по созданию бактерий, устойчивых к еще более высоким концентрациям этанола.

Сброженный яблочный сок известен под названием *сидр*. В технологии производства сидра и вина есть много сходного. Этапы изготовления сидра:

1. Яблоки прежде всего измельчают в кашу и отжимают сок. Для этого применяют как прессы, так и другие устройства. Способы подготовки сока перед брожением разнообразны. Сок может использоваться как без обработки, так и после подавления в нем естественной микрофлоры и замещения ее дрожжами подходящих штаммов. Чаще всего сок обрабатывают сернистым газом, чем подавляют развитие *Kloeckera apiculata*, неблагоприятно влияющих на вкус готового сидра.

2. Брожение путем добавления диких дрожжей или дрожжевой культуры-закваски. Разные штаммы дрожжей образуют специфические ароматические вещества. Поэтому при производстве сидра точно так же, как в пивоварении, можно использовать разные штаммы для придания напитку специфического вкуса. Чтобы получить сидр определенного сорта, добавляемые дрожжи должны преобладать над дикими, быстрее размножаться и определять конечные свойства продукта. Запуск процесса доминирующим видом дрожжей – один из наиболее распространенных способов, применяемых при крупномасштабном производстве сидра. Важно, чтобы дрожжи могли образовывать полигалактуронидазу, необходимую для гидролиза деэтерифицированных пектинов до галактуроновой кислоты. В противном случае в конце брожения сидр не просветляется. Фермент полигалактуронидазу получают из грибов и используют для просветления сидра.

3. По завершении брожения сидр отделяют от дрожжей и осветляют. Поскольку в сидре есть яблочная кислота, то, как в вине, в нем может

начаться яблочно-молочнокислородное брожение. Такое брожение не происходит, если сидр очень кислый или его содержат на холоде.

Хотя уксус не относится к алкогольным напиткам, но одна из двух стадий его получения включает спиртовое брожение. Уксус – это продукт, содержащий не менее 4% (вес/объем) уксусной кислоты. Его получают с помощью двустадийного процесса:

1. Спиртовое брожение, в ходе которого сахар-сырье превращается в спирт при участии *S. cerevisiae*. Сырьем может быть любой продукт, который сбраживается с образованием спирта. После завершения этого этапа дрожжам дают осесть и собирают надосадочную жидкость. В собранной надосадочной жидкости содержание этанола доводят до 10-13%. Если в ходе брожения для подавления роста бактерий добавляют сернистый газ, то перед дальнейшими операциями его удаляют.

2. Превращение этанола в уксусную кислоту (промежуточный метаболит – ацетальдегид). Все процессы получения уксуса происходят при участии смешанных культур *Acetobacter*, в некоторых случаях применяют закваски. Брожение происходит в аэробных условиях с потреблением больших количеств кислорода и выделением тепла.

Химия пищевых веществ и питание человека. В пище человека выделяют основные (белки, жиры, углеводы в соотношении 1:1:4) и минорные компоненты (витамины, микроэлементы, органические кислоты и др. Пища имеет энергетическую ценность и биологическую ценность.

Энергетическая ценность определяется количеством освобождаемой энергии при окислении основных компонентов пищи: 1 г белков при окислении дает 4,1 ккал или 17,2 кДж, 1 г жиров при окислении дает 9,3 ккал или 39,0 кДж и 1 г углеводов при окислении дает 4,1 ккал или 17,9 кДж. Соотношение компонентов пищи в зависимости от выполняемой работы может временно нарушаться.

Биологическая ценность пищи определяется незаменимыми (не синтезируемыми в организме) компонентами. Из 100 г потребляемых ежедневно белков 50% должно приходиться на животные белки, которые содержат полный набор незаменимых аминокислот (из 8 незаменимых аминокислот в растениях отсутствует триптофан). Скорость и объем синтеза белка определяется концентрацией аминокислоты, содержащейся в наименьшем количестве. Из 100 г ежедневной потребности в жирах 25% должно приходиться на полиненасыщенные жирные кислоты – линолевую и линоленовую в виде растительных масел. В организме человека могут синтезироваться только жирные кислоты с одной двойной связью – пальмитолеиновая и олеиновая. Жирные кислоты с 2 и 3 двойными связями (линолевая и линоленовая) должны поступать с пищей. Если они поступают, то в организме способна синтезироваться арахидоновая кислота (4 двойные связи), являющаяся предшественницей важнейших биорегуляторов простагландинов, лейкотриенов, простациклинов и тромбоксанов. Углеводы, содержащие α -гликозидные связи могут превращаться ферментами человеческих тканей. В них же в реакциях пентозофосфатного пути могут

образовываться мономеры углеводов от 3 до 8 углеродных атомов. Незаменимым компонентом пищи является целлюлоза в виде волокон клетчатки (30-35 г/сутки), которые необходимы для перистальтики кишечника. Очевидно, что витамины и элементы являются незаменимыми компонентами, определяющими ее биологическую ценность.

В постсоветском пространстве проявились эффекты недостаточности питания населения. У большинства населения России, по данным Института питания РАМН, выявлены нарушения полноценного питания, обусловленные как недостаточным потреблением пищевых веществ (таблица 9), так и нарушением пищевого статуса населения России. Важнейшими нарушениями пищевого статуса населения России являются:

- избыточное потребление животных жиров;
- дефицит полиненасыщенных жирных кислот;
- дефицит витаминов (аскорбиновой кислоты, тиамина, рибофлавина, фолиевой кислоты, ретинола, токоферола и др.);
- дефицит минеральных веществ (кальция, железа);
- дефицит микроэлементов (селена, цинка, иода, фтора);

Таблица 9

Потребление основных продуктов питания в России, кг/год на 1 человека (по А.П.Нечаеву, 2003)

Продукты	Норма	1990	1994	1999	1999, % от нормы
Хлеб	117	119	124	117	100
Мясо	78	72	57	42	54
Рыба	23,7	20	10	8,4	29
Молоко	390	386	278	206	53
Яйца, шт.	291	297	236	224	77
Сахар	38	47	29	34	89
Картофель	117	106	122	123	105
Овощи	139	89	68	79	57
Фрукты	80	35	28	30	37
Масло, растит.	13,0	10,2	6,6	8,9	68

Рассмотрим подробнее биотехнологические аспекты приготовления молочных и хлебобулочных продуктов питания.

Продукты из молока. Молоко – это гетерогенная система, в которой в качестве дисперсной фазы выступают эмульгированные жировые глобулы и коллоидные мицеллы казеина, а в роли дисперсионной среды – раствор белков, лактозы, солей и витаминов. Молоко создано эволюцией для питания новорожденных млекопитающими. Молоко человека отличается от коровьего молока наличием липазы, устойчивой к действию кислоты и пепсина в желудке. Общее содержание белков в молоке колеблется от 2,9 до 3,5%. Среди них выделяют две основные группы: казеины и сывороточные белки (таблица 10).

Таблица 10

Состав и молекулярные характеристики белковых компонентов молока (по А.П.Нечаеву, 2003).

Компоненты	Белки, % от общих белков	Белки, г/л	Молекулярная масса, кДа	ИЭТ
Казеин:	78-85	...		
α_{S1} -казеин	43-54	12-15	23,0	4,4-4,8
α_{S2} -казеин		3-4	25,0	-
β -казеин	25-35	9-11	24,0	4,8-5,1
κ -казеин	8-15	2-4	19,0	5,4-5,8
Белки сыворотки	15-25	6-8		
β -лактоглобулин	7-12	3,6	18,3	5,1
α -лактальбумин	2-5	1,7	14,2	4,2-4,5
Иммуноглобулины	1,5-2,5	0,6	150-1000	5,5-8,3
Альбумин сыворотки крови	0,7-1,3	0,4	69,0	4,7-4,9

В молоке содержится более 20 ферментов: протеиназы, амилаза, ксантиноксидаза, пероксидаза, каталаза, липаза, холинэстераза, лизоцим и др. Обнаружено присутствие ряда гормонов в молоке: трийодтиронин, тироксин, пролактин, окситоцин, кортикостероиды и др. В стабилизации жировых глобул молока принимают участие специальные белки.

При образовании четвертичной структуры казеина большая роль отводится гидрофобным взаимодействиям и фосфат-кальциевым мостикам и меньшая – электростатическим и водородным связям. Кальций в составе казеинкальциевого фосфатного комплекса выполняет роль структурообразователя, создавая мостик между сериофосфатными группами двух молекул казеина, а остатки фосфорной кислоты усиливают кислые свойства белка. Казеины легко перевариваются в пищеварительном тракте и являются источниками незаменимых аминокислот, кальция, фосфора и ряда физиологически активных пептидов. В белках молока содержатся в избыточных количествах лизин и триптофан с одновременным недостатком серосодержащих аминокислот. Белки сыворотки (0,5-0,8% от общего количества белков молока) содержат незаменимые аминокислоты в значительно больших количествах, чем казеин, включая лизин, треонин, триптофан, метионин и цистеин.

Казеин из молока осаждается при pH 4,6-4,7, когда на его молекулах наступает равенство положительных и отрицательных зарядов (ИЭТ – изоэлектрическая точка). Осажденный казеин практически не растворяется в воде, но растворяется в слабощелочной среде и растворах солей щелочных металлов и минеральных кислот. Нерастворимый казеин обладает способностью связывать воду в достаточно больших количествах (более 2 г на 1 г белка), что очень важно для устойчивости частиц белка в сыром, пастеризованном или стерилизованном молоке. Гидрофильные свойства казеина усиливаются при взаимодействии его с β -лактоглобулином, которое

наблюдается в процессе тепловой обработки молока, и от них зависят структурно-механические свойства сгустков, образующихся при кислотном свертывании или получении сырной массы при созревании сыров.

Промышленные казеины получают из обезжиренного молока действием кислот, кисломолочной сыворотки, введением солей кальция, химозина или других ферментов. В зависимости от способа получения различают казеинат натрия, казеинат кальция, кислотный, сычужный казеин и копреципитат с разными функциональными свойствами. При производстве новых форм белковой пищи (аналогов мясных и рыбных продуктов) используют гелеобразование казеина, взаимодействие казеина с веществами небелковой природы, образование стойких эмульсий, пенообразующие свойства неполных гидролизатов казеина и копреципитатов.

Свертывание казеина (например, при изготовлении сыров) происходит под влиянием микробных ферментов и молочной кислоты или при помощи сычужного фермента. В свертывании принимают участие молочнокислые бактерии *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorus*. В результате свертывания белка кальций отделяется от казеина, последний выпадает в виде хлопьев водонерастворимой казеиновой кислоты.

Молочная сыворотка делится на два вида: 1) сладкая, образующаяся при производстве сыров и 2) кислая, получаемая при осаждении творога и казеинов. Для применения молочной сыворотки в качестве добавок в хлебопекарной, кондитерской промышленности, для производства смесей детского питания ее концентрируют методами сушки, ультрафильтрации, электродиализом и осаждением белка в виде комплексов с полиэлектролитами. Для получения изолятов, концентратов и копреципитатов применяют термоденатурацию с последующим осаждением белка в ИЭТ (рН 4,5-4,6) и комплексообразование с анионными полисахаридами (карбоксиметилцеллюлоза – КМЦ, альгинаты, пектины). Эти способы позволяют выделять до 70-90% полноценного белка молочной сыворотки и направленно изменять его свойства.

Ферментация. В пищевой промышленности ферментацию чаще всего применяют для получения молочных продуктов. В сквашивании молока обычно принимают участие стрептококки и молочнокислые бактерии. Лактоза в процессе ферментации превращается в молочную кислоту. С помощью последующих или сопутствующих реакций получают другие продукты переработки молока: пахта, сметана, йогурт, сыр. Свойства конечного продукта зависят от характера и интенсивности ферментативных реакций. Те реакции, которые сопутствуют основному процессу образования молочной кислоты, обычно и определяют особые свойства продуктов. Так, именно вторичные реакции ферментации, идущие при созревании сыров, определяют вкус отдельных их сортов. В некоторых таких реакциях принимают участие пептиды, аминокислоты и жирные кислоты, присутствующие в продуктах.

В молоке при ферментации могут протекать шесть основных реакций, в результате образуется молочная, пропионовая или лимонная кислоты,

этанол, масляная кислота или же происходит колиформное газообразование. Главная из этих реакций – образование молочной кислоты; на этой реакции основаны все виды сквашивания (ферментации) молока. Лактоза (молочный сахар) молока гидролизуется с образованием глюкозы и галактозы. Обычно галактоза превращается в глюкозу еще до сквашивания. Имеющиеся в молоке бактерии преобразуют глюкозу в молочную кислоту. Образование сгустка казеина происходит в изoeлектрической точке этого белка (pH 4,6) под действием молочной кислоты. Этот процесс лежит в основе сыроварения.

Маслянокислое брожение с образованием углекислого газа используют при производстве швейцарского сыра. Этот тип брожения обуславливает своеобразный вкус (букет) этих сыров и образование глазков.

Лимоннокислое брожение используется при производстве пахты, сметаны и сливочного сыра, обеспечивая вкусовые качества этих продуктов. Вкус складывается из составляющих вкусов диацетила, пропионовой и уксусной кислот и других соединений.

Спиртовое брожение применяется при переработке молока в России (но не в Америке или Европе) – кефир, кумыс, айран. При производстве других продуктов спиртовое брожение, вызываемое дрожжами *Torula* стараются подавить. Нежелательны также маслянокислое брожение и колиформное газообразование.

Различные процессы ферментации молока проводят сегодня в контролируемых условиях. В течение тысячелетий они осуществлялись при участии бактерий, изначально присутствующих в молоке. В настоящее время используют разнообразные закваски, позволяющие получать молочные с заданными свойствами. Применяющиеся культуры живых бактерий могут являться одним штаммом определенного вида (культуры моноштаммов), либо несколькими штаммами и/или видами (моноштаммовые или смешанные культуры). Коммерческие культуры-закваски состоят из бактерий, образующих молочную кислоту и вещества, формирующие запах.

Сыр готовят из творога, полученного в результате свертывания казеина цельного или обезжиренного молока. Для изготовления различных видов сыра используют овечье, козье, коровье или кобылье молоко. В зависимости от технологии сыроварения сыворотку полностью или частично отделяют от творога на фильтр-прессе. Творог засевают культурами микроорганизмов в соответствии с сортом получаемого сыра. При его созревании под влиянием выделяемых микроорганизмами ферментов химический состав и физические свойства творога существенно меняются. Например, острый привкус сыра Рокфор обусловлен действием микробной липазы (за счет освобождаемых при липолизе жирных кислот – капроновой, каприловой, каприновой и др.). Созревание сыра длится от нескольких недель до нескольких месяцев. В первые недели созревания число микроорганизмов в массе сыра увеличивается и достигает нескольких сотен миллионов на 1 г массы сыра, затем число живых бактерий и дрожжей снижается. Сыр созревает при пониженной температуре.

Йогурт – один из древнейших продуктов, получаемый путем ферментации. После термообработки молоко заквашивают добавлением 2-3% закваски йогурта. Главную роль здесь играют бактерии *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Для получения желаемой консистенции продукта, вкуса и запаха эти организмы должны содержаться в культуре примерно в равных количествах. Кислоту в начале заквашивания образует в основном *Streptococcus thermophilus*. Смешанные закваски обновляют, поскольку при пересевах соотношение бактериальных культур изменяется.

Масло получается по наиболее простой технологии из молока. В зависимости от сорта производимого масла используют сливки с концентрацией от 30-32 до 30-40%. При их сбивании эмульсия масла в воде превращается в эмульсию воды в масле. При производстве масла с целью улучшения вкуса используют штаммы *Streptococcus lactis* и близких видов, а затем – смешанные культуры *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc citrovorum*, *L. dextranicum*. В настоящее время для улучшения органолептических свойств масла разрабатываются технологии с использованием липаз и дозированного управляемого липолиза.

Сброженная пахта. Сброженный продукт получают из свежей пахты, а также из снятого молока путем добавления закваски, используемой при производстве масла (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *Leuconostoc citrovorum*, *L. dextranicum*). Эти микроорганизмы необходимы для формирования вкуса и запаха пахты (в основном, за счет стрептококков), а также образуют молочную кислоту (за счет молочнокислых стрептококков) для формирования кислого вкуса, свертывания молока и оптимизации pH для образования летучих ароматических веществ бактериями.

Сметана готовится путем добавления к сливкам 0,5-1% закваски, используемой при производстве масла. Далее продукт выдерживают, пока концентрация кислоты не достигнет 0,6%.

Лактозу получают из сыворотки, образуемой при приготовлении сыра (в 1 т сыворотки содержится 50 кг молочного сахара). Лактоза нашла широкое применение в пищевой, микробиологической и фармацевтической промышленности.

Вторичное молочное сырье. При производстве 1 т сыра образуется 9 т сыворотки и пахты. В каждой тонне сыворотки содержится около 5 кг высококачественного белка, витамины группы В, комплекс свободных аминокислот, важнейшие минеральные компоненты, включая кальций и фосфор. Разработаны биотехнологии рационального использования сыворотки и пахты. На вторичном молочном сырье можно выращивать культуры кормовых дрожжей, обладающих лактазной активностью.

Безлактозные продукты. Поскольку многие люди не переносят лактозу пищи из-за недостаточности кишечной лактазы, разработаны способы выпуска молока и молочных продуктов, обработанных β -галактозидазой. Это фермент дрожжевого, бактериального или плесневого

происхождения катализирует гидролитическое расщепление лактозы на галактозу и глюкозу.

Хлебные продукты. Злаки бедны лизином (2,2-3,8%), изолейцином, метионином (1,6-1,7 мг/100 г белка), треонином (2,6%). Наиболее сбалансированными по аминокислотному составу являются овес, рожь и рис. При последовательной обработке муки или размолотого зерна водой, 5-10% раствором хлорида натрия, 60-80% водным раствором этанола и 0,1-0,2% раствором гидроксида натрия экстрагируются белковые фракции, соответственно названные альбуминами (5,2-24,5%), глобулинами (4,7-42,6%), проламинами (1,1-41,6%) и глютелинами (12,3-63,2%). Нерастворимые белки оболочек – склеропротеины (7,2-23,3%). Свойства клейковины (белковые компоненты муки) определяют качество пшеничного хлеба и зависят от присутствия глютеина (придает упругие свойства) и глиадина (обуславливает растяжимость и связность). Предполагают, что полипептидные цепи глиадина в разных местах и разными связями соединяются с полимеризованными молекулами глютеиновой фракции, объединяя их в сложную трехмерную сетку переплетающихся полипептидных цепей. Общеизвестна гипотеза, согласно которой фосфолипиды являются составной частью липопротеина, выполняющего роль слоистой структуры между белковыми пластинками и обеспечивающего деформацию скольжения. С клейковинным комплексом пшеницы находится во взаимодействии протеаза, их белковые ингибиторы, амилазы и липоксигеназа.

Тепловая денатурация белков является одним из основных физико-химических процессов, лежащих в основе выпечки хлеба, печенья, сухарей и пр. Этот вид превращений относится к полезным, так как он ускоряет переваривание белков в пищеварительном тракте человека. Агрегирующая и комплексообразующая способность белков пшеницы является одним из важных показателей, обеспечивающих им ведущую роль в формировании клейковины в процессе ее отмыкания из муки и тестоведения. Для оценки параметров агрегации смешивают растворы клейковинных белков в 0,01 н уксусной кислоте и 0,2 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 5,6), содержащем 2 М хлорида натрия. Измеряют оптическую плотность раствора при 350 нм во времени агрегации процесса и рассчитывают коэффициент начального этапа агрегации (K) и показатель агрегации (t_{10}/c), характеризующий степень помутнения раствора в течение 10 мин.

Константу начальной скорости агрегации рассчитывают по уравнениям: $K = \tau/c^4$ и $\tau^3 = 3\tau^t + \tau_0^3$, где τ – оптическая плотность раствора при 350 нм; τ – постоянная, отражающая изменение τ^3 в первые 1-1,5 мин агрегации; t – время агрегации; τ_0 – оптическая плотность при $t = 0$; c – концентрация белка, %. Параметры агрегации белков сильных пшениц, характеризующиеся более «плотной» пространственной упаковкой структуры, выше по сравнению со слабыми, имеющими более «рыхлую» организацию молекул. Процесс образования белковых агрегатов по ходу технологического процесса приготовления изделий из муки интенсивнее у

крепкой клейковины, чем у слабой. Гидратация белков при замесе теста или отмывании клейковины приводят к снижению агрегирующих свойств.

В агрегации и взаимодействии молекул клейковинных частиц с другими компонентами муки при производстве хлеба, наряду с водородными связями, принимают участие гидрофобные, ионные и дисульфидные связи. Этот процесс зависит от pH, ионной силы среды (с повышением pH агрегация белков злаков повышается), от концентрации нейтральных солей (при повышении концентрации NaCl агрегирующая способность белков повышается), от присутствия детергентов, лабильности дисульфидно-сульфгидрильного обмена (ослабление напряжения структур клейковины при замесе теста). Сильная мука, содержащая крепкую клейковину, требует больше времени замеса, так как она содержит больше дисульфидных связей и меньше сульфгидрильных групп, чем слабая.

В процессе созревания муки при ее отлежке, а также под влиянием окислителей типа броматов, улучшение реологических свойств клейковины объясняется увеличением содержания дисульфидных связей и уменьшением свободных сульфгидрильных групп. В присутствии восстанавливающих агентов (сульфит натрия) реологические свойства клейковины ухудшаются, как это имеет место в прорастающем зерне или в процессе приготовления теста из зерна, пораженного клопом-черепашкой. Возможно улучшение качества приготовления хлеба через воздействие на ферменты тиол-дисульфидного обмена. Приготовление хлеба сопряжено с изменениями вторичной, третичной и четвертичной структур белков и не затрагивает первичную структуру белков клейковины.

Хлебопродукты. Для производства хлеба в основном применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Обычно их выращивают в ферментерах периодического действия на мелассе (свекловичной или из сахарного тростника). Этапы приготовления продукта:

- в простейшем случае готовят тесто, смешивая при комнатной температуре муку, воду, дрожжи и соль;
- при замесе слои теста перемещаются, создаются условия для образования пузырьков газа и подъема теста;
- замешанному тесту дают возможность «подойти», затем его режут на куски, формуют путем раскатывания и складывания для достижения нужной текстуры и выдерживают во влажной атмосфере;
- при выдержке и стадии выпечки образовавшиеся при замесе и формовке «зародыши» газовых пузырьков наполняются углекислым газом (он выделяется в ходе анаэробного сбраживания глюкозы муки);
- поднявшееся тесто выпекают; в ходе этого термического процесса крахмал желатинизируется, дрожжи погибают и тесто частично обезвоживается.

В результате получается имеющий заданную форму, плотный по консистенции продукт с легкой ячеистой структурой и корочкой.

Помимо углекислого газа при анаэробном брожении образуются разнообразные органические кислоты, спирты и эфиры, которые определяют вкус хлеба.

Молекулярная биотехнология и производство коммерческих продуктов. Развитие многих отраслей науки и техники стало возможным благодаря успехам молекулярной биотехнологии.

Иммунологические и ДНК-диагностические тесты в диагностике заболеваний. Для своевременной диагностики и эффективной профилактики заболеваний человека и животных необходимо определить этиологический фактор (причину) – вирусы, бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы, белки и низкомолекулярные соединения. Для этого используют различные типы исследования: микроскопическое, определение антител, культивирование клеток *in vitro*, гибридизация, полимеразная цепная реакция и др.

Эффективный диагностический тест должен быть:

- высокоспецифичным в отношении молекулы-мишени;
- чувствительным для выявления небольших количеств мишени;
- простым, но обеспечивающим получение однозначных и воспроизводимых результатов.

В настоящее время выделяют две основных группы методов молекулярной диагностики:

- 1) основан на сродстве антитела к конкретному антигену (ELISA);
- 2) основан на идентификации специфических нуклеотидных последовательностей с помощью гибридизации или ПЦР.

ELISA включает следующие основные этапы:

1. Образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твердой подложке, чаще используют пластиковые 96-луночные плашки.
2. К фиксированному образцу добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы первого антитела.
3. В лунку добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой. К этому антителу присоединен фермент, катализирующий превращение неокрашенного субстрата в окрашенный продукт (чаще, щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреазы). Промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы конъюгата второе антитело-фермент.
4. Добавляют в лунку неокрашенный субстрат.
5. Проводят количественное (качественное) определение окрашенного продукта.

Основной принцип ELISA – специфическое связывание первого антитела с мишенью (белок, клетка). Применение моноклональных антител позволило существенно повысить специфичность метода ELISA, поскольку они связываются с одним, строго определенным антигенным сайтом. Напомним, что антитела продуцируют В-клетки (В-лимфоциты). Каждая

клетка системы иммунитета вырабатывает одно антитело, которое распознает отдельный участок (эпитоп, антигенную детерминанту) молекулы антигена. Поскольку в молекуле антигена присутствует несколько разных эпитопов, антитела против каждого из них вырабатываются отдельными клетками системы иммунитета. Такие антитела, каждое из которых взаимодействует с данным антигеном, называют поликлональными. Они вариабельны по количеству, в связи с чем не нашли применения в методе ELISA. Известно, что В-клетки не воспроизводятся в культуре. Но после слияния с миеломными клетками удалось получить гибридомы и выделить растущие и делящиеся в культуре клоны клеток, которые продуцируют высокоспецифичные моноклональные антитела. Их и используют в методе ELISA.

Если первое антитело не связывается с мишенью, то оно удаляется при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело-фермент не с чем связываться, он удаляется при втором промывании, и образец остается неокрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе антитело присоединяется к первому, и конъюгированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.

Моноклональные антитела широко применяются в настоящее время при определении полипептидных гормонов, маркеров опухолей, цитокинов, лекарственных препаратов, различных низкомолекулярных биорегуляторов, возбудителей инфекционных заболеваний.

Системы ДНК-диагностики основаны на гибридизации нуклеиновых кислот – спаривание двух комплементарных сегментов разных молекул ДНК. Известно, что информация о фенотипе организма заключена в его генетическом материале. Так, патогенность бактерий определяется наличием у них специфического гена или набора генов, а наследственное генетическое заболевание возникает в результате повреждения определенного гена. Сегмент ДНК, детерминирующий данный биологический признак, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить диагностическим маркером. Ход анализа:

1. Фиксация одноцепочечной ДНК-мишени на мембранном фильтре.
2. Нанесение меченой одноцепочечной ДНК-зонда, которая при определенных условиях (температуре и ионной силе) спаривается с ДНК-мишенью.
3. Промывание фильтра для удаления избытка несвязавшейся меченой ДНК-зонда (РНК-зонда). Специфичность реакции зависит от качества зонда.
4. Детекция гибридных молекул зонд/мишень. ДНК-диагностика основывается на обнаружении известных нуклеотидных последовательностей; для этого синтезируют специфические праймеры и амплифицируют последовательность-мишень. Это позволяет использовать нерадиоактивные системы детекции (например, хемилюминесцентный метод) или регистрировать ПЦР-продукты методом гель-электрофореза. ПЦР-продукты помечают также флюоресцентным красителем.

Методы гибридизации нуклеиновых кислот используются при анализе исходного материала (например, выявление определенного микроорганизма) без специального выделения их: проводят гибридизацию с ДНК-мишенями, присутствующими в образцах кала, мочи, крови, смывах из зева, в тканях и объектах окружающей среды. Если концентрация последовательности мишени в исследуемом образце слишком мала, ее можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Метод геномной дактилоскопии (ДНК-типирование) часто используется в судебной медицине для идентификации биологических образцов (кровь, сперма, кусочек кожи, волосы). В образцах оценивают содержание ДНК и подвергают ее расщеплению с помощью эндонуклеаз, полученные фрагменты ДНК разделяют методом агарозного электрофореза и выделенные фрагменты переносят на нейлоновые фильтры. Проводят последовательную гибридизацию с четырьмя или пятью радиоактивно мечеными зондами, каждый из которых распознает определенную последовательность ДНК (как правило минисателлитные ДНК, не кодирующие белки, многократно встречающиеся в геноме человека и состоящие из tandemно повторяющихся участков; ребенок наследует одну минисателлитную последовательность от одного родителя, а другую – от второго). Гибридизованные фрагменты визуализируют радиоавтографически. «ДНК-отпечаток» данного индивида представляет собой набор различающихся по длине фрагментов, соответствующих минисателлитным последовательностям его генома. Такой отпечаток характерен для каждого человека, как отпечаток пальцев. Метод применяют для установления отцовства. Если в образце мало ДНК и она не очень сильно разрушена, можно амплифицировать небольшие участки минисателлитной ДНК с помощью ПЦР и провести анализ. Метод геномной дактилоскопии длительный – недели, месяцы.

Диагностика специфических наследственных заболеваний человека на генетическом уровне дает ответ на вопрос, входят ли обследуемые индивидуумы или их потомки в группу повышенного генетического риска. ДНК-анализ можно использовать для выявления носителей генов наследственных заболеваний, а также для пренатальной (дородовой) и пресимптоматической (на этапе, когда нет проявлений) диагностики серьезных генетических нарушений, выявлять специфические мутации. ДНК-тесты не требуют экспрессии мутантного гена (т.е. биохимического анализа его продукта-белка) для его выявления. Поэтому интенсивно разрабатываются системы скрининга для всех моногенных заболеваний с использованием ДНК-тестов.

Метод «ДНК-отпечатков» используется для установления различий между растительными культурами. Для характеристики ДНК растений используют набор произвольных олигонуклеотидных праймеров, проводят ПЦР-амплификацию случайных фрагментов ДНК, осуществляют электрофорез и получают специфичный для каждого растения набор полос ДНК (метод RAPD – random amplified polymorphic DNA).

Перечисленные выше и другие методы молекулярной диагностики постоянно развиваются. В 1994 году объем мирового рынка ДНК-диагностических тестов был равен 80 млн. долларов США, а спустя десять лет составит 2 млрд. долларов США.

Микробиологическое производство лекарственных средств. Белковые лекарственные препараты ранее получались в небольших количествах из крови и тканей человека или животных. В настоящее время клонировано более 400 генов различных белков человека (внедренных и потенциальных лекарственных средств). Эти гены вводят в бактерии и экспрессируют. Белковые продукты экспрессии выделяют, очищают и переводят в маркетинговый вид.

Развитие технологии рекомбинантных ДНК даст в качестве лекарственных средств: ферменты; антитела (иммуноглобулины); лекарства пришитые к вариабельному фрагменту моноклональных антител (направленный транспорт в клетку, имеющую иммунную детерминанту комплементарную антителу); токсические вещества, избирательно связывающиеся с ВИЧ-инфицированными клетками и убивающими их и др.

Объем мирового рынка лекарственных средств на основе рекомбинантных белков увеличивается на 12-18% в год и в 2000 году составил около 20 млрд. долларов США.

Вакцины. В настоящее время в мире страдают 2 млрд. людей заболеваниями, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации. В последнее время делаются попытки создать вакцину против белка, переносящего эфиры холестерина в кровеносном русле и играющего важную роль в патогенезе атеросклероза, клинические проявления которого уносят каждую вторую жизнь. Традиционные вакцины содержат инаktivированные патогенные микроорганизмы (бактерии или вирусы). Их получение является трудоемким процессом и они не всегда специфичны. Некоторые вакцины дают побочные эффекты. Вакцины полученные технологией рекомбинантных ДНК лишены ряда недостатков, присущих натуральным вакцинам:

- удаляя гены, ответственные за вирулентность (вызывание заболевания), получают эффективные живые вакцины, лишенные осложнений;
- клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного (болезнетворного) микроорганизма, встраивают в непатогенный носитель (чаще вирус) и получают безопасную вакцину;
- гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенных микроорганизмов, встраивают в экспрессирующие векторы, получают нужный продукт в большом количестве и используют как вакцину;
- пептидные вакцины получают с помощью методик химического синтеза пептидов.

Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения низкомолекулярных биорегуляторов. С помощью технологии

рекомбинантных ДНК можно получить не только белки, но и низкомолекулярные метаболиты. Для этого следует изменить метаболизм клетки либо путем регуляции активности ключевых ферментов определенного метаболического пути, либо вводя гены/модифицируя существующие гены, продуктами экспрессии которых являются ферменты нового метаболического пути. В настоящее время созданы рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать L-аскорбиновую кислоту (одно из первых исследований 1985 года), краситель индиго, аминокислоты, антибиотики, мономерные единицы различных биополимеров. Этот подход может превратить бактерии не только в «фабрики» по производству белков с заданными свойствами, но и низкомолекулярных веществ с необычными (не токсичными для данного микроорганизма-производителя) свойствами. Например, весьма востребован каучук, получаемый из особых растений. Его биосинтез начинается с превращения простых сахаров и включает 17 ферментативных реакций. В ходе последней из них происходит полимеризация аллилпирофосфатных остатков с образованием цис-1,4-полиизопрена. Для получения рекомбинантных микроорганизмов, производящих каучук было проведено:

- с помощью мРНК из растения *Hevea brasiliensis*, синтезирующего каучук, была создана библиотека кДНК;
- произведена гибридизация ДНК-зондом, соответствующим по нуклеотидной последовательности гену полимеразы каучука;
- полученный клон кДНК (или несколько клонов, кодирующих несколько ферментов пути синтеза каучука) можно ввести в бактериальные клетки;
- продуктом экспрессии таких рекомбинантных клеток будет биополимер - каучук.

Вариантом использования кДНК, кодирующей ферменты синтеза каучука, может быть ферментативная биосинтетическая технология *in vitro*.

Биодеградация токсических соединений. Примерно 40 лет назад были открыты почвенные микроорганизмы, способные разрушать чужеродные вещества (ксенобиотики). Оказалось, что разные штаммы *Pseudomonas* способны расщеплять более 100 органических соединений. В 1981 году А.М. Чакрабартти получил патент на получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений. Он взял четыре разные бактерии, каждая из которых имела плазмиду (ДНК), кодирующие определенные ферменты деградации одного вещества, и создал микроорганизм («супербацила»), содержащий плазмиды, которые обуславливали деградацию четырех веществ: камфары, октана, салицилата и нафталина. Объединяя плазмиды разных штаммов *Pseudomonas* в одном хозяине, можно создать организм, способный деградировать заданный комплекс загрязняющих веществ. С помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенного метаболического пути (модифицируя специфичность ферментов) и подобрать условия ферментативной деградации ксенобиотиков

(например, обезвреживание в воде при температуре, близкой к точке замерзания и др.). Использование технологии рекомбинантных ДНК может сделать процесс обезвреживания токсических веществ во внешней среде более безопасным и дешевым по сравнению с существующими заводами по утилизации отходов.

Биотехнология и растениеводство. Скорость роста и урожайность растений в естественных условиях зависят от их генотипа, доступности питательных веществ, наличия в почве полезных микроорганизмов и отсутствия патогенных. Создание штаммов микроорганизмов, усиливающих рост растений включает четыре основных направления:

- оптимизация молекулярных механизмов фиксации азота, чтобы уменьшить количество вносимых удобрений;
- усиление образования корневых клубеньков симбиотическими бактериями;
- обеспечение микробиологического синтеза веществ, хелатирующих железо (сидерофоров) с целью подавления роста фитопатогенов;
- микробиологический синтез фитогормонов для усиления роста растений.

В настоящее время в сельском хозяйстве используют бактерии семейств *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*, которые вступают в симбиотические отношения со строго определенными растениями. Молекулярно-генетические исследования показали, что фиксация азота бактериями – это сложный процесс, в котором участвует семь координировано регулируемых оперонов, кодирующих в общей сложности 20 разных белков. Такая сложная система пока не может быть введена в растение, чтобы оно само без помощи азотфиксирующих бактерий утилизировало азот. Вступая в симбиотические отношения с растениями, штаммы *Rhizobium* стимулируют образование на их корнях клубеньков, где и происходит размножение этих бактерий и фиксация азота. Процесс образования клубеньков требует функционирования продуктов экспрессии множества генов и также пока не имеет реальных генно-инженерных подходов для оптимизации (конкуренции с менее эффективными дикими штаммами).

Опосредованная стимуляция роста растений с помощью бактерий состоит в защите растений от их повреждения фитопатогенными грибами и бактериями. Такие защитные бактерии синтезируют специфические вещества, стимулирующие рост растений: сидерофоров, антибиотики, ферменты, фитогормоны.

Микробные инсектициды. Известно, что число описанных видов насекомых приближается к 1 млн. Некоторые насекомые являются переносчиками заболеваний человека и животных, а также могут наносить ущерб урожаю сельскохозяйственных культур. Химические инсектициды (хлорорганические – дихлордифенилтрихлорэтан, ДДТ и фосфорорганические – малатион, паратион, диазинон) оказывают вредное влияние на человека, а ДДТ может накапливаться и сохраняться до 20 лет, нанося ущерб живым организмам окружающей среды. Под «микробным

инсектицидом» понимают микроорганизм синтезирующий токсическое вещество для подавления жизнедеятельности определенных насекомых или инфицирующий насекомое-мишень и приводящий к его гибели. Микробные инсектициды не оказывают вредного влияния на окружающую среду, но помогают регулировать численность насекомых. Рассмотрим некоторые примеры микробных инсектицидов:

- некоторые подвиды бактерии *Bacillus thuringiensis* образуют протоксин, который в условиях щелочной среды кишечника насекомых и под действием пищеварительных протеиназ превращается в убивающий насекомое активный токсин;

- для расширения видов насекомых-мишеней, были созданы рекомбинантные бактерии, несущие гены нескольких токсинов *Bacillus thuringiensis*;

- гены токсинов *Bacillus thuringiensis* вводили в микроорганизмы, обитающие в поверхностном слое воды и служащие пищей для личинок комаров; аналогичный подход был использован для борьбы с насекомыми, повреждающими корни растений;

- бакуловирусы, патогенные для небольшого числа насекомых, были трансформированы путем введения генов, обеспечивающих синтез инсектицида в течение всего жизненного цикла вируса или синтеза смертельных для насекомых нейротоксинов.

Таким образом, технология рекомбинантных ДНК позволяет получить новые продукты имеющие прямую коммерческую ценность (тесты, лекарства, вакцины, низкомолекулярные биорегуляторы, белки) и опосредованную путем совершенствования технологических процессов очищения внешней среды и повышения эффективности сельского хозяйства.

Трансгенные растения. Получение высокоурожайных растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды остается актуальной научно-практической задачей. Эта задача решается с помощью традиционных селекционных подходов (длительный процесс, 10-15 лет) и новых технологий генетической инженерии (результат за 3-5 лет). В настоящее время разработано несколько эффективных систем переноса ДНК и экспрессирующих векторов, которые работают в растительных клетках. Одним из достоинств растительных клеток является их *тотипотентность*: из одной клетки может быть регенерировано целое растение. Из клеток, сконструированных генноинженерными методами, можно получить фертильные растения, все клетки которых несут чужеродный(е) ген(ы) – *трансгенные растения*. Если такое растение цветет и дает семена, то введенная генетическая информация будет передаваться по наследству, т.е. следующим поколениям растения.

Трансгенные растения, не содержащие маркерные гены. Обычно при введении чужеродного гена, кодирующего желаемый признак, в растение одновременно вводится и селективный маркерный ген. Продукты экспрессии маркерных генов служат для отбора клеток с желаемыми свойствами, например, по их чувствительности к антибиотикам. Выполнив свою

вспомогательную роль по трансформации растительной клетки, селективные маркерные гены способны вызывать негативные эффекты:

- белки-продукты их экспрессии могут оказаться аллергенами или токсинами;
- гены устойчивости к антибиотикам могут попасть в патогенные почвенные микроорганизмы;
- один селективный маркерный ген не используется дважды, поэтому его присутствие может затруднить трансформацию трансгенных растений дополнительными генами.

В связи с этим были предложены методы удаления маркерных генов из трансгенных растений. Например, получение безмаркерных трансгенных растений включает котрансформацию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный ген, а другая – вводимый ген желаемого признака. В этом случае 30-80% растений содержат оба гена, которые введены в разные участки хромосомной ДНК. После отбора трансформированных растений с помощью продуктов экспрессии маркерного гена, его удаляют из трансгенного растения путем обычного скрещивания.

Устойчивость к насекомым-вредителям. В конце прошлого века в мире было израсходовано более 4 млрд. долларов на использование химических инсектицидов. Их многократное применение (опрыскивание) в течение вегетационного периода требует технических устройств и отвлечения людей. Поэтому целесообразно создание растений (например, злаковых), способных продуцировать функциональные инсектициды. Для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, с помощью генноинженерных методов были разработаны различные технологии.

Один из популярных подходов базируется на использовании гена инсектицидного протоксина, продуцируемого *Bacillus thuringiensis* (микробный инсектицид). Инсектицид (токсин белковой природы) находится в клетке в виде так называемого параспорального кристалла – структуры, которая образуется во время споруляции бактерий. На его долю приходится 20-30% сухой массы спорующей культуры (95% - белок, 5% - углеводы). Кристалл – это четвертичная структура белка, диссоциирующая на субъединицы при щелочном значении pH. Выделяют 4 основных класса токсина: CryI – токсичен для чешуекрылых, CryII – для чешуекрылых и двукрылых, CryIII – для жесткокрылых, CryIV – для двукрылых, которые разделяются на подклассы и подгруппы. В параспоральном кристалле инсектицид неактивен; при солюбилизации кристалла белок высвобождается в форме протоксина, предшественника активного токсина. Молекулярная масса протоксина CryI около 130 кДа. После заглатывания насекомым параспорального кристалла протоксин активируется в кишечнике в условиях щелочного pH (7,5-8,0) и под действием пищеварительных протеиназ превращается в активный токсин с молекулярной массой 68 кДа. Этот токсин встраивается в мембрану эпителиальных клеток кишечника и образует канал, через который утрачивается часть АТФ и других компонентов клетки. Насекомое перестает питаться, обезвоживается и погибает. Для создания

трансгенных растений, которым введен ген токсина *Bacillus thuringiensis* было использовано несколько приемов.

1. Был введен ген N-концевой части молекулы токсина (отвечает за токсичность) и вместе с сильным растительным промотором (для повышения экспрессии гена); количество синтезированного растением токсина увеличилось и была достигнута некоторая защита от насекомых (трансгенный томат). Эффективность такого подхода была недостаточной из-за того, что в переносимом гене присутствовали нуклеотидные последовательности, характерные для бактерий и замедляющие экспрессию гена в растительных клетках.

2. С помощью сайт-специфического мутагенеза, а также химического мутагенеза были получены измененные гены токсина, клонирование которых в растительных клетках увеличило продукцию токсина в 100 раз. В США проведены успешные испытания и дано разрешение на использование инсектицидного токсина *Bacillus thuringiensis* для повышения устойчивости картофеля к колорадскому жуку. Следует помнить, однако, о необходимости постоянного контроля популяции насекомых-вредителей, с тем чтобы вовремя обнаружить устойчивые организмы. В настоящее время ведутся работы по введению бактериального гена холестеролоксидазы в хлопчатник для борьбы с личинками хлопкового долгоносика (фермент разрушает эпителиальные клетки средней кишки насекомого).

3. Были проведены эксперименты, которые показали возможность индукции синтеза протоксина путем обработки трансгенного растения недорогим и безопасным химическим веществом (например, салициловой или полиакриловой кислотой) в определенный момент вегетационного периода. Такая периодичность синтеза позволяет замедлить развитие устойчивости у насекомых к микробному инсектициду, продуцируемому растением. Аналогичные системы могут оказаться полезными для регуляции синтеза самых разных чужеродных белков в трансгенных растениях.

Другой подход базируется на том, что некоторые растения синтезируют ингибиторы протеиназ, которые, попадая в кишечник насекомого, блокируют гидролиз растительных белков. Возникло предположение о введении растительного гена ингибитора протеиназ с сильным растительным промотором в растительные клетки. Например, был клонирован ген, кодирующий ингибитор трипсина вигны китайской, в табак. Оказалось, что ущерб, наносимый личинками совки (*Heliothis virescens*) трансгенным растениям, синтезирующим более 2 мкг ингибитора трипсина на 1 мг растительного белка, был значительно меньше, чем в случае обычных растений. Введение гена ингибитора II протеиназы картофеля в растения риса защищает их от розового стеблевого точильщика (*Sesamia inferens*), основного насекомого-вредителя для этой культуры; заражение приводит к образованию полых стеблей и мертвых метелок без семян. Поскольку растительные ингибиторы протеиназ являются обычными компонентами рациона человека и животных и в процессе приготовления пищи быстро

инактивируются, их введение в новые зерновые культуры можно считать безопасным.

Третий подход сформировался на основе двух предыдущих: использование токсина *Bacillus thuringiensis* и ингибитора протеиназ сериновой природы. Оказалось, что смесь очищенного токсина *Bacillus thuringiensis* в количестве, обеспечивающем минимальную смертность насекомых, и ингибитора протеиназ в низких концентрациях обладает в 20 раз большей инсектицидной активностью, чем один протоксин *Bacillus thuringiensis*.

Четвертый подход предполагает введение в растительные клетки гена, кодирующего ингибитор альфа-амилазы. Большой ущерб зерновым наносят зерновка (*Callosobruchus maculatus*) и долгоносик лучистой фасоли (*C. Chinensis*). Если питать этих насекомых обычной фасолью (*Phaseolus vulgaris*), то они погибают из-за присутствия в ней ингибитора альфа-амилазы, а следовательно подавления гидролиза крахмала – основного продукта питания насекомых. Был выделен ген этого ингибитора и клонирован в растение, весьма чувствительное к насекомым, горох (*Pisum sativum*). В результате были получены растения трансгенного гороха, устойчивые к обоим насекомым.

Устойчивость к вирусам. Вирусы растений существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры попытались перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивость растений быстро утрачивалась. Природный иммунитет к вирусным инфекциям обуславливается разными причинами:

- блокированием проникновения вируса в растение;
- предотвращение распространения вируса в здоровые клетки;
- подавление симптомов вирусной инфекции.

Чтобы получить растения, устойчивые к вирусам, проводили их «иммунизацию» вирусными генами, кодирующими белки оболочки, другими вирусными генами или бессмысленными последовательностями вирусного генома. Обнадёживающие результаты были получены, если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса: создано множество трансгенных зерновых и других растений. Механизм подавления пролиферации вирусных частиц в присутствии произведенного растением белка оболочки вируса пока неясен. Ценность подхода увеличивается в связи с тем, что ген белка оболочки одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов.

Защита растений от патогенных вирусов может осуществляться естественными противовирусными белками, синтезируемыми самими растениями. Например, в клеточной стенке фитолакки американской (*Phytolacca americana*) присутствуют три разных противовирусных белка: РАР, синтезируемый в листьях весной, РАРII, обнаруживаемый в листьях летом, и РАР-S, содержащийся в семенах. Эти белки легко выделить из водных экстрактов измельченных тканей растения. Если небольшое

количество РАР нанести на листья других растений, то последние также окажутся устойчивыми к нескольким вирусам. Ген РАР был использован для получения трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов растений.

Устойчивость к гербицидам. Известно, что почти 10% урожая теряется из-за сорняков. Для борьбы с сорняками используется около 100 химических гербицидов, на производство которых в мире тратится 10 млрд. долларов США. В присутствии гербицидов сельскохозяйственные растения не должны терять продуктивность. Для этого их необходимо генетически трансформировать, чтобы:

- уменьшить поглощение гербицида культурным растением;
- уменьшить способность белка, чувствительного к гербициду, к связыванию с ним;
- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду в таком количестве, чтобы его хватало на выполнение присущих ему функций в присутствии гербицида;
- обеспечить инактивацию гербицида в ходе метаболизма культурного растения.

Были получены растения, устойчивые к глифосфату – гербициду, быстро разлагающемуся в почве на нетоксические составляющие и потому безопасному для окружающей среды. Глифосфат является ингибитором 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) – фермента, играющего важную роль в синтезе ароматических аминокислот и у бактерий, и у растений. Из глифосфатустойчивого штамма *E.coli* был выделен ген, кодирующий EPSPS, помещен под контроль растительного промотора и введен в растительные клетки. Трансгенные растения табака, петунии, томата, картофеля и хлопка, синтезировавшие EPSPS в количестве, достаточном для замены ингибированного гербицидом растительного фермента, были устойчивы к глифосфату и при обработке, в отличие от сорняков, не погибали.

Устойчивость к грибам и бактериям. Фитопатогенные грибы наносят ощутимый ущерб сельскохозяйственной продукции. Например, в странах, где выращивается рис, ущерб от гриба, вызывающего пирикулярриоз риса, оценивается в 5 млрд. долларов. Выведены растения, устойчивые к болезнетворным грибам, за счет переноса и экспрессии генов PR-белков (pathogenesis-related proteins) – β -1,3-глюканаза, хитиназа, тауматинподобные белки, ингибиторы протеиназ. Все эти белки подавляют жизнедеятельность патогенных грибов.

Ущерб, наносимый урожаю картофеля почвенной бактерией *Erwinia carotovora*, составляет до 100 млн. долларов в год. Химических способов защиты от этого патогена не существует. Поэтому было создано трансгенное растение картофеля, способное экспрессировать ген лизоцима бактериофага Т4. Лизоцим секретировался в апопласт (межклеточное пространство, т.е. в компартмент куда проникают болезнетворные бактерии и лизировал их. Поскольку лизоцим лизирует различные грамположительные и

грамотрицательные растения, этот подход перспективен для защиты растений от других патогенных бактерий.

Устойчивость к неблагоприятным воздействиям и старению. Растение не способно активно избегать неблагоприятных факторов внешней среды: высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высоких температур, концентраций солей и др. Для защиты срабатывают эволюционно отобранные механизмы «физиологического стресса». В составе этих реакций присутствуют свободнорадикальные, вызывающие образование радикальных форм кислорода – «окислительный стресс» - супероксидный, гидроксидный, пероксидный радикалы. Для обезвреживания супероксидного радикала служит фермент супероксиддисмутаза. Известно, что Cu/Zn-супероксиддисмутаза содержится в хлоропластах, Mn-супероксиддисмутаза – в митохондриях; некоторые растения синтезируют Fe-супероксиддисмутаза. Созданы трансгенные растения устойчивые к очень яркому свету путем переноса и экспрессии гена Cu/Zn-супероксиддисмутаза: у контрольных растений фотосинтетическая активность утрачивалась, а у трансгенных сохранялась на уровне 94%.

Растения, произрастающие на засоленных почвах, синтезируют нетоксичные вещества – осмопротекторы. Они способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение макромолекул, присутствующих в клетках растений, под действием высоких концентраций солей. Осмопротекторами являются сахара, спирты, пролин и четвертичные соединения аммиака. Одним из высокоактивных осмолитиков является бетаин, который накапливается в некоторых растениях во время засухи или при высокой засоленности почв. Были созданы устойчивые растения путем переноса гена кишечной палочки, кодирующий синтез ферментов бетаинообразования.

Контроль времени созревания плодов. Преждевременное созревание и размягчение плодов затрудняет их транспортировку. Известно, что при созревании плодов в растениях активируются специфические гены, кодирующие ферменты целлюлазу и полигалактуроназу. Если подавить их экспрессию, созревание будет замедляться. Созданы трансгенные растения томата, в которых нарушен синтез полигалактуроназы, плоды которых удобны для транспортировки и с 1994 года разрешены к реализации Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США как безопасные. Другим фактором, ускоряющим созревание плодов, является этилен. Он синтезируется из S-аденозилметионина с образованием промежуточного продукта 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АСС). Созданы трансгенные растения томата, в которых подавлен синтез ААС, а, следовательно, и этилена. Из некоторых почвенных растений был выделен ген ААС-деаминазы и введен в геном томата. Полученные растения синтезировали меньше этилена, чем нормальные, а их плоды тоже имели гораздо более длительный срок хранения.

Изменение декоративных свойств растений. Примерно 70% объема индустрии цветоводства приходится на долю четырех растений: роз, гвоздик, тюльпанов и хризантем. В окраске цветов важную роль играют флавоноиды - антоцианины. Они синтезируются из фенилаланина. Окраска цветка определяется химическими свойствами флавоноидов, например, цианидина (красный цвет) и дельфинидина (синий цвет). Созданы трансгенные цветковые растения, у которых подавлена или введена новая ферментативная реакция в метаболических цепях превращений антоцианинов, что обеспечило новые коммерчески выгодные варианты формы и окраски цветов.

Трансгенные растения, синтезирующие Mn-супероксиддисмутазу, в 3-4 раза менее чувствительны к действию озона. В перспективе – создание трансгенных цветковых растений, содержащих супероксиддисмутазу, препятствующую увяданию.

Изменение пищевой ценности растений реализуется методами генетической инженерии по следующим направлениям:

- изменение аминокислотного состава запасных белков семян;
- изменение жирнокислотного состава плодов;
- улучшение вкуса фруктов путем введения в растения гена монеллина (растительного белка, имеющего сладкий вкус).

Известно, что запасные белки, которые служат источниками углерода и азота прорастающих семян, состоят из ограниченного повторяющегося набора аминокислот, среди которых отсутствуют некоторые незаменимые аминокислоты. Для повышения биологической ценности запасных белков, например, путем обогащения лизином, был апробирован метод отмены ингибирующего действия лизином своего собственного синтеза. Для этого в растительные клетки были введены регуляторные гены биосинтеза лизина микробного происхождения, которые отличались от растительных тем, что они не чувствительны к ингибирующему действию лизина. В семенах полученных трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина.

Считают, что спустя 5-7 лет в мире будет выработано растительного масла на сумму 70 млрд. долларов. Около 75% всех масличных культур приходится на долю сои, пальмы, рапса (канолы) и подсолнечника. В получаемых маслах содержатся пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая жирные кислоты. С помощью генетической инженерии созданы десятки сортов рапса, которые синтезировали масла с измененным жирнокислотным составом. Каждый трансгенный сорт содержал один дополнительный ген, который кодировал белки-ферменты, обеспечивающие накопление одной жирной кислоты.

Изменения внешнего вида и вкуса. Изменение цвета овощей и фруктов начинается с окисления монофенолов и о-дифенолов до о-хинонов. Этот процесс катализируют полифенолоксидазы, локализующиеся в мембранах хлоропластов и митохондрий. Начаты исследования по созданию трансгенных растений, окраску которых можно будет контролировать через введение и экспрессию генов полифенолоксидазы.

В плоде африканского растения *Dioscorephyllum cumminsii* Diels содержится белок монеллин, примерно в 100000 раз более сладкий, чем сахара в эквивалентных количествах. Ген монеллина был химически синтезирован и введен в растительные клетки инфицированием их *A. tumefaciens*, используя Ti-плазмиды. Монеллин был обнаружен в зрелых помидорах и листьях салата.

Растения как биореакторы. Для использования рекомбинантных бактерий, производящих белки или низкомолекулярные биорегуляторы, требуются биореакторы и квалифицированный персонал. Создание трансгенных растений для тех же целей менее затратно. В настоящее время имеются экспериментальные установки по получению с помощью растений моноклональных антител, функциональных фрагментов антител и подверженного биодegradации биополимера поли-β-гидроксibuтирата. Рассмотрим этапы создания трансгенного растения, производящего данный биополимер.

1. В бактериях *Alcaligenes eutrophus* поли-β-гидроксibuтират синтезируется из ацетил-КоА в тремя ферментами, гены которых входят в один оперон. Растения могут экспрессировать только один ген.

2. Каждый из генов был клонирован по отдельности и встроен в хлоропластную ДНК растения *Arabidopsis thaliana*.

3. Два трансгенных растения, каждое со своим чужеродным геном, скрещивали, чтобы получить растения с двумя чужеродными генами, включенными в хлоропластную ДНК.

4. Полученное трансгенное растение с двумя чужеродными генами скрещивали с растением, несущим третий чужеродный ген, и отбирали растения, несущие все три бактериальных гена поли-β-гидроксibuтирата. В листьях такого трансгенного растения, экспрессирующего все три бактериальных гена, синтезировалось более 1 мг поли-β-гидроксibuтирата на 1 г сырой ткани листа.

К настоящему времени на рынок поступило лишь небольшое число генетически модифицированных растений, в основном соя, однако можно ожидать их стремительное производство в обозримом будущем.

Трансгенные животные. Стратегия скрещивания и отбора, хотя и требует много времени, остается основой выведения новых пород сельскохозяйственных животных, птицы и рыб. Однако после выведения эффективной генетической линии добавление новых признаков без риска утраты создаваемых свойств потребовало новых методических и биотехнологических подходов, в частности, путем переноса ядра из эмбриональной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром (перенос ядра, клонирование):

- клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки;
- инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в матку самки;
- отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках;

- скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Эта идея реализована на практике в 1980 гг. Были введены новые термины: трансгенное животное (генотип изменен введением чужеродной ДНК), трансген – вводимая ДНК, трансгеноз – процесс создания трансгенного животного.

Трансгенные животные: методология. Введение чужеродной ДНК животным осуществляют несколькими способами:

1. С помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента. Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион («суррогатные» матери), производят на свет трансгенное потомство.

2. Микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки. У млекопитающих после проникновения сперматозоида в яйцеклетку ядро спермия (мужской пронуклеус) и ядро яйцеклетки существуют отдельно. Мужской пронуклеус обычно гораздо больше женского, его легко локализовать с помощью секционного микроскопа и ввести в него чужеродную ДНК. Это лежит в основе метода получения линий трансгенных животных методом микроинъекций.

- Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Гиперовуляция вызывается введением самкам сыворотки беременной кобылы и хорионического гонадотропина человека (увеличивается образование яйцеклеток в 3-7 раз).

- Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки.

- Яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенное потомство.

3. Введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития. Этот метод получил развитие в экспериментах на мышах. Клетки, выделенные из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генетической инженерии без нарушения их плюрипотентности.

- ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши.

- Их трансформируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансформированные клетки методом позитивно-негативной селекции или ПЦР.

- Популяцию трансформированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей.

- Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей.

4. Клонированием с помощью переноса ядра. Опыты были поставлены на овцах (у этих животных в течение первых трех делений зиготы, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК и ни один из генов не экспрессируется). Клонирование овечки Долли из ядра дифференцированной клетки осуществляли следующим образом.

- Ядро яйцеклетки удаляли с помощью микропипетки.

- Культивировали эпителиальные клетки молочной железы (дифференцированные клетки) взрослой особи и переводили их в фазу клеточного цикла G_0 .

- Осуществляли слияние эпителиальных клеток в G_0 -фазе и яйцеклеток, лишенных ядра. Получали яйцеклетки с ядрами от эпителиальных клеток.

- Выращивали восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцеводe с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза.

- Имплантировали яйцеклетки с ядрами эпителиальных клеток молочной железы в матку «суррогатной» матери, где и происходило развитие плода.

Все перечисленные обладают крайне низкой эффективностью и не могут пока найти широкое применение в практике. Так, например, при получении клонированной овечки было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в фазе G_0 ; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

5. Для трансгеноза используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Напомним, что дрожжи – это эукариотические клетки, в которых возможна посттрансляционная модификация белков. Таким образом были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера).

Трансгенные сельскохозяйственные животные. Для создания трансгенных коров использовали схему трансгеноза методом микроинъекций ДНК:

- Отбор ооцитов коров, забитых на скотобойне.

- Созревание ооцитов *in vitro*.

- Оплодотворение бычьей спермой *in vitro*.

- Центрифугирование оплодотворенных яйцеклеток для концентрирования желтка, который в нормальных яйцеклетках мешает визуализации мужского пронуклеуса с помощью секционного микроскопа.

- Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус.

- Развитие эмбрионов *in vitro*.

- Нехирургическая имплантация одного эмбриона реципиентной самке во время течки.

- Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена.

В тестовых экспериментах из пула в 2470 ооцитов были получены два трансгенных теленка. Метод дает результат, но пока характеризуется низкой эффективностью.

Трансгеноз крупного рогатого скота может преследовать следующие цели:

- Изменение содержания в молоке различных его компонентов. Например, увеличение доли капа-казеина позволит увеличить получение сыра.

- Введение гена лактазы позволит получить молоко, в котором разрушена лактоза. Такое молоко могут употреблять в пищу люди с дефектом лактазы пищеварительного тракта (непереносимость молока).

- Выведение животных, устойчивых к вирусным и бактериальным инфекциям, а также к паразитарным инвазиям. Разрабатываются методы введения генов, ответственных за продукцию белков неспецифической и иммунной резистентности.

- Использование молочной железы коров как биореактора. Предположим, что корова дает в год 10000 л молока, содержащего 35 г белка в 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество рекомбинантного белка и эффективность его очистки составит 50%, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг такого белка в год. Примерно столько белка С требуется ежегодно, например, для предотвращения тромбообразования в сосудистом русле больных людей.

Трансгенные овцы и козы создавались для биосинтеза и секреции в молоко белков человека: активатор плазминогена, антитрипсин, фактор IX системы свертывания крови, лактоферрина, урокиназы, интерлейкина-2 и др. В отличие от трансгенных бактерий-прокариот, в молочных железах-биореакторах достигалась посттрансляционная модификация человеческого белка, в частности – гликозилирование. Были созданы трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти. Удалось создать трансгенных свиней, способных синтезировать человеческий гемоглобин.

Большой интерес представляет ксенотрансплантация клеток и тканей животных человеку. Например, трансплантация гормонпродуцирующих клеток инсулярного аппарата поджелудочной железы больным диабетом. Основная проблема таких операций заключается в остром отторжении ксенотрансплантата за счет активации комплемента. Были созданы трансгенные свиньи, пересаживаемые клетки которых содержали гены ингибиторов комплемента. Благодаря их экспрессии синтезировались белки, предотвращающие острую реакцию отторжения пересаженных человеку клеток свиньи.

Трансгенные птицы и рыбы. Получение трансгенных птиц оказалось достаточно сложной проблемой. В настоящее время трансгенные цыплята воспроизводятся трансфекцией изолированных клеток бластодермы.

Выделенные клетки трансфицируют трансгеном с помощью липосом и вводят в подзародышевую область облученной бластодермы реципиента. Часть полученных потомков являются химерами, а некоторые из них, несущие трансген в клетках зародышевой линии, при скрещивании могут дать начало трансгенным линиям.

Трансгенных цыплят можно использовать для улучшения генотипа уже существующих пород – для придания им устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызываемым кокцидиями, повышения эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в яйцах, повышения качества мяса. Было предложено также использовать яйцо с его высоким содержанием белка в качестве источника белковых продуктов, используемых в фармацевтической промышленности. Экспрессия трансгена в клетках репродуктивного пути курицы, где обычно секретируется большое количество овальбумина, может способствовать накоплению соответствующего белкового продукта в яйце, откуда его можно затем выделить.

По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рекомбинантной рыбы в искусственных условиях путем трансгеноза. Трансгены вводят микроинъекцией ДНК или электропорацией оплодотворенных яйцеклеток. Эмбриогенез рыб протекает в водной среде вне организма, поэтому в имплантации нет необходимости. Все дальнейшие процессы могут протекать в резервуарах с регулируемой температурой. Выживаемость эмбрионов рыб после микроинъекций высокая (35-80%), а доля трансгенных потомков колеблется от 10 до 70%. Изучено влияние трансгена гормона роста на скорость роста рыб. Приведем технологию трансгеноза, пригодного «для всех рыб», обитающих в холодной воде. В яйцеклетки атлантического лосося введен трансген, состоящий из следующих элементов:

- промотор гена антифризного белка американской бельдюги;
- кДНК гормона роста лосося;
- сигналы терминации/полиаденилирования 3'-конца гена антифризного белка американской бельдюги.

Полученные трансгенные лососи были крупнее и быстрее прибавляли в весе, чем контрольные нетрансформированные рыбы. Годовалые трансгенные особи, полученные в результате введения в яйцеклетки нерки генетической конструкции гормона роста, весили в 11 раз больше, чем нетрансгенные.

Предполагается, что в будущем гены устойчивости к болезням и стрессовым воздействиям, а также гены, обуславливающие другие биологические особенности, будут введены как рыбам умеренных широт, так и тропическим рыбам.

Имеется надежда, что трансгеноз позволит улучшать генотип существующих пород домашнего скота и выводить породы животных с новыми признаками.

Контроль применения генноинженерных методов. Внедрение молекулярной биотехнологии и генной инженерии сопровождается решением ряда смежных проблем – этических, правовых, экономических и социальных. Уже при возникновении этих наук были высказаны опасения по поводу безопасности технологии рекомбинантных ДНК. Ученым пришлось наложить мораторий на некоторые исследования в этой области до принятия официальных правил работы с рекомбинантными микроорганизмами. Согласно этим правилам, эксперименты можно было проводить только с теми из них, которые неспособны размножаться вне лаборатории, а сами исследователи должны были быть защищены от какой бы то ни было опасности (1974-1975 гг). Широко распространено мнение, что попадание генетически модифицированных организмов в окружающую среду может привести к неконтролируемому распространению их в экосистемах.

Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК. В 1976 г. Национальные институты здравоохранения США (NIH, от National Institutes of Health), финансирующие и координирующие этот тип исследований издали инструкцию, в которой:

- сформулировано требование, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались только микроорганизмы, неспособные размножаться и передавать свою ДНК другим микроорганизмам вне лаборатории;
- рекомендовалось работы с патогенными микроорганизмами проводить в боксах с отрицательным давлением;
- предлагалось работы с микроорганизмами проводить в помещениях, оборудованных высокоэффективными системами фильтрации;
- полностью запрещались эксперименты с преднамеренным высвобождением в окружающую среду любых организмов, содержащих рекомбинантную ДНК.

Однако само создание генетически модифицированных организмов (ГМО), способных выживать в природных экосистемах, было неизбежным. И тогда был создан Консультативный комитет NIH по рекомбинантным ДНК (NIH Recombinant DNA Advisory Committee, NIH-RAC). Он должен был контролировать исследования, связанные с рекомбинантными ДНК, и при необходимости изменять действующие правила.

До настоящего времени три проблемы еще не нашли адекватного решения:

- как контролировать производство и потребление пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы или полученных с их использованием;
- как контролировать преднамеренное высвобождение ГМО в окружающую среду (военные разработки, терроризм);
- как контролировать лекарственные препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

В большинстве стран имеются Центры сертификации и контроля пищевых продуктов и пищевых добавок. Одним из первых такой центр был

создан в США – Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA, от Food and Drug Administration). Документы и Правила FDA явились основой для многих национальных Центров сертификации и контроля пищи. Каждый продукт должен пройти тестирование на соответствие ряду специфических критериев в зависимости от своей природы, прежде чем он будет разрешен к употреблению человеком.

Понятие о GMP, GLP и GCP. Для изучения фармакологической активности химических веществ и безопасности их воздействия на человека используют правила GLP и GCP.

1. Правилах добротного и безопасного производства (GMP – Good Manufacturing Practice) включают требования к биотехнологическому производству. Здесь учитываются не только технологические процессы получения рекомбинантных белков и других продуктов, но и безопасность производства.

2. Правила GLP. Начиная с 1976 года, когда в США были впервые предложены правила добротной лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP), во многих странах происходит совершенствование технологий доклинического испытания ксенобиотиков – потенциальных лекарств и других биологически активных веществ. Основная цель GLP – обеспечение достоверности результатов доклинических испытаний природных и синтетических ксенобиотиков, гарантирующих их безопасность для человека и животных. В 1992 году в России были приняты Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP, ЗВ 64-126-91).

Изучение безопасности ксенобиотиков (новых оригинальных потенциальных лекарственных средств) проводится в полном объеме: общая токсичность (острая, подострая, хроническая, местное раздражающее действие, цитотоксичность), специфическая токсичность (лекарственная зависимость, антигенность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность), фармакокинетические исследования (всасывание, распределение, выделение, метаболизм, биодоступность), общепармакологическое действие и пирогенность инъекционных ксенобиотиков.

3. Правила GCP. Правила проведения клинических испытаний химических веществ – лекарственных средств (Good Clinical Practice – GCP) представляют собой международный этический и научный стандарт качества для планирования и проведения исследований на людях, а также документального оформления и представления их результатов. Требования данных правил должны соблюдаться при проведении клинических испытаний лекарственных средств, результаты которых утверждаются государственными органами.

Безопасность пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, в том числе добавок, придающих продуктам специфический вкус и запах, должна быть гарантирована еще до получения лицензии, разрешающей их введение в товарооборот и подтверждающей, что такие продукты можно употреблять в

пищу. Правила, регламентирующие проведение экспериментов с рекомбинантными ДНК, были разработаны Национальными институтами здравоохранения США в конце 70-х годов прошлого века и пересмотрены спустя 10 лет. В России с 1 июля 1999 г. вступило в силу постановление Министерства здравоохранения РФ «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников». Согласно этому документу гигиеническая экспертиза пищевых продуктов и продовольственного сырья, а также компонентов (фрагментов) для их производства, полученных из генетически модифицированных источников должна включать определение вносимой последовательности генов, маркерных генов антибиотиков, промоторов, стабильности генетически модифицированных организмов на протяжении нескольких поколений, а также санитарно-химические показатели качества и безопасности, результаты токсикологических исследований на лабораторных животных, оценку аллергенных свойств продукта, возможных мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов. Кроме этого, обязательна технологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированного сырья – органолептических свойств и физико-химических параметров. В республике Беларусь аналогичные функции выполняет государственное предприятие «Республиканский центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Научные и практические санитарногигиенические исследования ведет сеть областных центров, возглавляемая научно-исследовательским институтом.

Патентование биотехнологических изобретений. Самая важная форма интеллектуальной собственности для биотехнологии – это изобретение. Изобретение охраняется патентом, который представляет собой узаконенный документ, обеспечивающий исключительные права патентовладельца на коммерческое использование изобретения. Традиционно патентуются микроорганизмы, разработаны нормы, согласно которым селекционерам представляются права на новые сорта растений, в США и Европе запатентована трансгенная мышь («онкомышь»), несущая активируемый ген, отвечающий за формирование опухоли, охраноспособными изобретениями считаются растения, полученные с помощью методов генной инженерии.

Практикум

Работа № 1. Знакомство с питательными среды для культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Основные компоненты питательных сред:

- макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, сера, магний, железо);
- микроэлементы (бор, цинк, медь, марганец, кобальт, йод, молибден);
- витамины;
- аминокислоты, пептиды (гидрализаты казеина), углеводы (сахароза или глюкоза);
- фитогормоны (ауксины и цитокинины) и другие биорегуляторы;
- этилендиаминотетрауксусная кислота (ЭДТА).

Источники ауксинов в питательных средах - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), индолилуксусная кислота (ИУК), индолилмасляная кислота (ИМК), нафтилуксусная кислота (НУК); источники цитокининов - аденин, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, 2ip. Для регуляции роста используют гибберелловую кислоту (ГК). ИУК в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции каллуса используют высокие концентрации 2,4-Д. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки клетки, подготавливают ее к делению. Затем цитокинины инициируют деление клеток. Молекулярный механизм действия ауксинов связан с индукцией ими синтеза главной протеинкиназы клеточного деления P_{34}^{cdc2} , а цитокинины индуцируют синтез циклинов, регулирующих прохождение клетки по клеточному циклу. Таким образом, действие этих биорегуляторов (растительных гормонов) проявляется только при последовательном или одновременном внесении их в среду.

Для культивирования клеток, тканей и органов растений используют следующие питательные среды.

Среда Мурасиге-Скуга

Компоненты питательной среды, мг/л			
NH_4NO_3	1650	KJ	0,83
KNO_3	1900	$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,8
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440	$Na_2EDTA \times 2H_2O$	37,3
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370	Тиамин-HCl	0,1
KH_2PO_4	170	Пиридоксин-HCl	0,5
$MnSO_4 \times 4H_2O$	24,1	Никотиновая к-та	0,5
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025	Мезоинозит	100
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8,6	Глицин	2,0
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025	Сахароза	3000
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,25		
pH 5,6-5,8			

Среда Уайта

Компоненты питательной среды, мг/л			
$Ca(NO_3)_2$	200	$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,02
$MgSO_4 \times 7H_2O$	360	$ZnSO_4$	1,5
Na_2SO_4	200	$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,0025
KNO_3	80	KJ	0,75
KCl	65	Пиридоксин HCl	0,1
NaH_2PO_4	16,5	Тиамин-HCl	0,1
H_3BO_3	1,5	Никотиновая к-та	0,5
$MnSO_4$	4,5	Глицин	3,0
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5	Сахароза	2000
pH 5,6-5,8			

Среда Гамборга и Эвелега (B₅)

Компоненты питательной среды, мг/л			
NaH_2PO_4	150	$Na_2EDTA \times 2H_2O$	30,0

KNO ₃	1500	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	KJ	0,75
MgSO ₄ ×7H ₂ O	250	FeSO ₄ ×7H ₂ O	28
CaCl ₂ ×2H ₂ O	150	Тиамин-HCl	10
H ₃ BO ₃	3,0	Пиридоксин HCl	1,0
MnSO ₄ ×4H ₂ O	10,0	Никотиновая к-та	1,0
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025	Мезоинозит	100
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	2,4-Д	2,0
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	2,0	Сахароза	2000
pH 5,8			

1. Сравните составы трех питательных сред. Найдите отличия. Сгруппируйте составные компоненты питательных сред (макроэлементы, микроэлементы, молекулы пластического обмена, биорегуляторы, ЭДТА). Свяжите состав питательных сред с молекулярными процессами в культивируемых клетках, тканях, органах.

2. Питательные среды готовят из «маточных» растворов, которые хранят при низкой температуре. В «маточных» растворах повышена концентрация макроэлементов в 10-20 раз, микроэлементов – в 100-1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Предложите варианты «маточных» растворов солей макроэлементов, Fe-хелата (FeSO₄×7H₂O + Na₂EDTA×2H₂O), солей микроэлементов, витаминов, биорегуляторов для быстрого приготовления рабочих питательных сред для культивирования.

Работа 2. Цветные реакции на белки и аминокислоты.

Диагностическое значение и принцип реакций. Цветные реакции дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях и получить представление об его аминокислотном составе.

Биуретовая реакция открывает пептидную связь в белке. Ее способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей. При добавлении сернокислой меди к сильнощелочному раствору белка или полипептида образуются соединения меди с пептидной группировкой, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет в зависимости от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты неполного его гидролиза (пептоны) - розовое или красное окрашивание.

Нингидриновая реакция характерна для α-аминогрупп. Растворы белка, α-аминокислот и пептидов при нагревании с нингидрином дают синее или фиолетовое окрашивание. В этой реакции α-аминокислоты и пептиды окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию с образованием аммиака, альдегида и CO₂. Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий цвет (комплекс Руэмана). Нингидриновая реакция

используется для количественного определения α -аминокислот в аминокислотных анализаторах.

Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белках циклических аминокислот - триптофана, фенилаланина, тирозина, содержащих в своем составе бензольное ядро. Большинство белков при нагревании с концентрированной азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при подщелачивании. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца этих аминокислот с образованием нитросоединений желтого цвета.

Реакция Миллона открывает в белке циклическую аминокислоту тирозин. При добавлении к раствору белка реактива Миллона, состоящего из смеси азотнокислых и азотистокислых солей закиси и окиси ртути, растворенных в концентрированной азотной кислоте, образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла), окрашивающийся при нагревании в красный цвет. Реактив Миллона дает окрашивание почти со всеми фенолами, и в случае белков реакция обусловлена присутствием в них фенольной группы тирозина. Белки, не содержащие тирозина, этой реакции не дают. Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, поскольку он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.

Реакция Фоля указывает на присутствие в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. Метионин, хотя и является содержащей серу аминокислотой, этой реакции не дает, поскольку сера в нем связана прочно. Реакция состоит в том, что при кипячении белка с реактивом Фоля (плюмбит натрия в избытке NaOH) под действием щелочи от цистеина или цистина легко отщепляется сера в виде сернистого натрия, который с плюмбитом дает черный или бурый осадок сернистого свинца.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Раствор едкого натра, 100 г/л.
2. Раствор сернистой меди, 10 г/л.
3. Раствор нингидрина, 5 г/л.
4. Азотная кислота концентрированная.
5. Реактив Миллона.
6. Раствор фенола, 1 г/л.
7. Реактив Фоля.
8. Раствор яичного белка для цветных реакций.

ХОД РАБОТЫ

Реагенты	Опыт	Контроль
Биуретовая реакция		
Раствор белка	5 кап	-
Вода	-	5 кап
NaOH, 10%	5 кап	5 кап
CuSO ₄ , 1%	2 кап	2 кап
Окрашивание		
Нингидриновая реакция		
Раствор белка	5 кап	-

Вода	-	5 кап
Раствор нингидрина	5 кап	5 кап
Кипятить 1-2 мин		
Окрашивание		
Ксантопротеиновая реакция		
Раствор белка	5 кап	-
Вода	-	5 кап
HNO ₃ , конц.	5 кап	5 кап
Кипятить до появления окраски раствора белка		
Окрашивание		
Реакция Миллона		
Раствор белка	5 кап	-
Вода	-	5 кап
Реактив Миллона	3 кап	3 кап
Нагреть до окрашивания осадка белка		
Окрашивание		
Реакция Фоля		
Раствор белка	5 кап	-
Вода	-	5 кап
NaOH, 30%	5 кап	5 кап
(CH ₃ COO) ₂ Pb, 5%	1 кап	1 кап
Кипятить до появления черного окрашивания		

Работа 3. Разделение аминокислот методом тонкослойной ионообменной хроматографии (УИРС).

Принцип метода. Разделение аминокислот из их смеси производят на катионообменной синтетической смоле типа дауэкс 50х8. Удобно пользоваться готовыми пластинками типа «Фиксион 50х8», на которых нанесен сильный катионит в натриевой форме. При нанесении образца на пластинку все аминокислоты должны сорбироваться в стартовой позиции путем их обмена с катионом натрия. Следовательно, все аминокислоты в исходной пробе должны быть в форме катионов, что достигается доведением наносимого раствора до pH ниже 2,2. Удержание аминокислот смолой зависит от степени диссоциации основных и кислотных групп аминокислоты (т.е. от величины их pK), от числа этих групп в молекуле, от способности к гидрофобным взаимодействиям со смолой и некоторых других условий. Ароматические и основные аминокислоты (арг, гис, лиз, фен, тир), а также лейцин прочно удерживаются на катионите. Для их разделения применяют пропускание через слой смолы цитратного буфера pH 5,25 с концентрацией Na⁺ 0,35 М. В этих условиях все остальные аминокислоты (кислые и нейтральные) приобретают высокую подвижность и идут с фронтом растворителя. Для выявления отдельных аминокислот пластинку опрыскивают раствором нингидрина. Появляются фиолетовые пятна аминокислот, располагающиеся по длине пластинки в последовательности по

степени возрастания подвижности аминокислот. Полуколичественная оценка содержания аминокислоты в смеси достигается путем сравнения величины пятна из анализируемого образца с пятном соответствующей стандартной аминокислоты.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ, ОБОРУДОВАНИЕ

1. Растворы аминокислот. Сначала готовят маточные растворы с концентрацией аминокислоты 40 мкмоль/мл. Для этого в 5 мл 0,01 н раствора HCl растворяют арг – 42 мг, гис – 42 мг, лиз – 36 мг, фен – 33 мг, тир – 36 мг, лей – 26 мг. Из них готовят рабочие растворы каждой аминокислоты, смешивая 0,1 мл маточного раствора и 0,9 мл 0,01 н раствора HCl. В полученных рабочих растворах содержится по 4 мкмоль/мл аминокислоты. 2. Стандартная смесь аминокислот готовится из полученных шести маточных растворов аминокислот, смешивая по 1 мл каждой и доводя общий объем до 10 мл 0,01 н раствором HCl. В полученной стандартной смеси содержатся аминокислоты, каждая из которых с концентрацией 4 мкмоль/мл. 3. Цитратный буфер, pH 5,28 (на 1 л буфера 24,6 г лимонной кислоты, 14,4 г NaOH, 6,8 мл 35% раствора HCl, 0,1 г фенола). 4. Нингидриновый реактив (раствор 1 – 1 г нингидрина в 100 мл ацетона; раствор 2 – 1 г ацетата кадмия в смеси 50 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл воды; рабочий раствор – 100 мл раствора 1 + 20 мл раствора 2).

ХОД РАБОТЫ

На пластинке мягким карандашом наносят линию старта на расстоянии 1,5-2,0 см от нижнего края. На этой линии через равные промежутки отмечают 7 точек для нанесения растворов аминокислот. С помощью капилляров в точки наносят по 1,5 мкл (3 касания) рабочих растворов каждой из шести аминокислот и смеси аминокислот (одно касание – 0,5 мкл, что соответствует $2 \cdot 10^{-3}$ мкмоль каждой аминокислоты). Между касаниями пятно подсушивать феном. Нельзя царапать слой катионита капилляром! Таким образом в первые шесть точек внесены последовательно арг, гис, лиз, фен, тир, лей, а в седьмую точку – смесь аминокислот.

В сосуд для хроматографии налить цитратный буфер pH 5,28 на высоту 1 см и поместить пластинку с нанесенными образцами. Стартовая позиция смеси аминокислот должна быть выше уровня налитого буферного раствора. Для разделения аминокислот буфер должен подняться по пластинке ровным фронтом на высоту 15 см. Для этого требуется около двух часов. Процесс разделения можно значительно ускорить, предварительно пропитав пластинки в 10 раз разбавленным буфером и высушив их.

По окончании разделения пластинки вынуть из сосуда с буфером, нижние края промокнуть фильтровальной бумагой и пластинки высушить феном. Высушенные пластинки установить в наклонном положении в вытяжном шкафу и опрыскнуть из пульверизатора нингидрином до равномерного пропитывания. Пластинки высушить и прогреть в термостате при 40-50 °C 20 мин. Выявляются фиолетовые пятна аминокислот в последовательности снизу вверх: арг, гис, лиз, фен, тир, лей. Сравнить положение пятен стандартных растворов аминокислот с положением их при

хроматографировании смеси аминокислот. Хроматограмму зарисовать в тетради.

Работа 4. Определение концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови биуретовым методом (набор НТК «Анализ-Х») - УИРС

Значение концентрации общего белка в сыворотке крови практически здоровых людей составляют: у взрослых 65-85 г/л, у детей до 6 лет - 56-85 г/л, у новорожденных - 53-89 г/л. Из колориметрических методов количественного определения белка особого внимания заслуживает биуретовый метод, основанный на биуретовой реакции. Принцип: в щелочной среде ионы меди образуют с белками комплексы фиолетового цвета. Интенсивность окрашивания в определенных пределах пропорциональна концентрации белка. Содержание белка устанавливается по интенсивности светопоглощения при 540-560 нм фотометрически. Для расчета количества белка в исследуемом растворе необходимо пользоваться калибровочным графиком, построенным по стандартным растворам белка.

СОСТАВ НАБОРА

1. Биуретовый реактив (3 флакона по 3,5 г). Приготовление раствора биуретового реактива: содержимое одного флакона растворить в 250 мл дистиллированной воды. Раствор хранится в холодильнике 7 суток.
2. Стандарт белка (раствор или лиофилизат).
3. В лаборатории биуретовый реактив можно приготовить по прописи: растворить 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) в 50 мл воды при энергичном перемешивании, добавляют 30 мл 10% раствора NaOH и 0,1 г KJ и доводят раствор до объема 100 мл.

ХОД РАБОТЫ

В пробирки помещают 0,05 мл сыворотки крови и 2,5 мл биуретового реактива, тщательно перемешивают, избегая образования пены. Через 30 мин измеряют оптическую плотность на КФК в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостую пробу ставят также, как опытную, но вместо сыворотки добавляют 0,05 мл физиологического раствора. Расчет ведут по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят ряд разведений стандартного раствора белка, как указано в таблице:

№ п/п	Стандартный раствор Белка (мл)	0,9% раствор хлорида натрия (мл)	Содержание белка (г/л)
1	0,2	0,3	$0,4 \times A$
2	0,3	0,2	$0,6 \times A$
3	0,4	0,1	$0,8 \times A$
4	Осн. станд. раствор	-	Осн. станд. раствор

A - концентрация стандартного раствора белка, указанная на флаконе.

Из каждого разведения необходимо взять по 0,05 мл и обработать как пробу. Через 30-60 мин измеряют оптическую плотность против холостой пробы. По полученным данным строят калибровочный график. Вычисляют факторы пересчета делением концентраций стандартных растворов на экстинкцию (оптическую плотность). Выводят средний фактор (F). Расчет ведут по формуле: $C_{оп.} = E_{оп.} \times F$, где $C_{оп.}$ – концентрация белка в пробе, F – усредненный фактор. При содержании белка в сыворотке больше 100 г/л, сыворотку разводят физиологическим раствором, а результат умножают на разведение. Этот метод не используют для определения количества белка в моче или спинномозговой жидкости.

Работа 5. Колоночная гель-фильтрация.

Для гель-фильтрации используются так называемые молекулярные сита – инертные гидратированные полисахаридные материалы, представляющие собой пористые гранулы. Их получают на основе декстрана (сефадексы – бактериальный полисахарид), агарозы (из некоторых морских водорослей) или полимеризованных акриламидных гелей (акрилекс).

Принцип метода. Разделительный гель состоит из гранул с определенным размером пор и межгранульного пространства. Молекулы, размер которых превышает размер пор гранул, движутся только в пространстве между гранулами и первыми выходят из колонки. Молекулы, размеры которых меньше размера пор, диффундируют в гранулы и обратно, поэтому их вымывание (элюирование) из колонки замедляется. Чем меньше молекулярная масса вещества, тем требуется больший объем элюирующей жидкости для вымывания его из колонки.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Раствор хлористого натрия, 8,5 г/л. 2. Гель сефадекса G-200 или 100 (или акрилексы соответствующих марок). 3. Смесь растворов: ненасыщенного раствора голубого декстрана, раствора гемоглобина 200 г/л, насыщенного раствора рибофлавина (1:1:1).

ХОД РАБОТЫ

Колонку для разделения веществ заполнить гелем, полученным при гидратировании сефадекса G-200 изотоническим раствором хлористого натрия. Над гелем всегда должен находиться слой изотонического раствора хлористого натрия, чтобы гель не высыхал. На поверхность геля нанести 2-3 капли раствора, представляющего собой смесь трех веществ: голубого декстрана (М.М. 10^7), рибофлавина (М.М. 3×10^2) и гемоглобина (М.М. $64,6 \times 10^3$). Раствор для фракционирования должен сначала впитаться гелем, затем в колонку внести 2 раза по 2 мл изотонического раствора хлористого натрия. После этого подключить капельницу с изотоническим раствором хлористого натрия, предназначенным для элюирования разделяемых веществ. При разделении смеси для гель-фильтрации необходимо следить, чтобы в колонке был ток жидкости (т.е. открыт зажим снизу). По мере прохождения через колонку элюирующего раствора смесь разделяется на фракции, окрашенные в различные цвета. Каждую фракцию собрать в

отдельную пробирку. В соответствии с относительной молекулярной массой быстрее всего элюируется декстран (голубой), а затем гемоглобин (красный) и рибофлавин (желтый). После элюирования смеси колонку необходимо промыть изотоническим раствором хлористого натрия до тех пор, пока гель станет бесцветным, затем закрыть и оставить небольшой слой раствора над гелем. Только в таком состоянии колонку можно использовать для работы повторно.

Работа 6. Определение термолабильности амилазы слюны.

Вариант 1

Реагенты	Опыт 1	Опыт 2	Контроль
Слюна 1:10, кап.	10	-	-
Кипяченая слюна, кап. (кипятить 2 мл разведенной слюны 5-8 мин, охладить)	-	10	-
H ₂ O, кап.	-	-	10
Крахмал 1%, кап.	10	10	10
Термостат 38° С 10 минут			
Реакция с йодом (5 кап. Раствора из пробирки + 1 кап. I ₂ в KI), окраска			
Реакция Троммера (5 кап. Раствора из пробирки+5 кап. 10% NaOH+3 кап. 1% CuSO ₄ , кипятить 1 мин.), окраска			
Вывод			

Вариант 2

Реагенты	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 4
Крахмал, 1%, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Слюна, 1:10, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Температура, °С	0	20	40	100
Инкубировать 10 мин и затем добавить по 1-2 капли J ₂ в КJ				
Зарегистрировать окрашивание				

Сделать выводы о влиянии температуры на скорость ферментативной реакции.

Работа 7. Определение оптимума pH для действия амилазы.

Реагенты	Значение pH					
	6,0	6,4	6,8	7,2	7,6	8,0
Буферный раствор, мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Крахмал 0,5%, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Слюна, 1:10, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Термостат 38°С 10 мин						
Раствор I ₂ в KI, кап	1	1	1	1	1	1

Окраска						
Вывод:						

Работа 8. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы.

Реагенты	Контроль	Опыт 1	Опыт 2
Слюна 1:10, мл	1,0	1,0	1,0
H ₂ O, кап.	2	-	-
NaCl, 1%, кап.	-	2	-
CuSO ₄ , 1%, кап.	-	-	2
Крахмал, 1%, кап.	5	5	5
Экспозиция 5 минут			
Раствор I ₂ в KI, кап.	1	1	1
Результат, окраска			
Вывод:			

Работа 9. Специфичность действия ферментов

Приготовить разведение слюны в 5 раз (1 мл слюны + 4 мл воды)

Реагенты	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 4
Слюна (амилаза), кап	5	5	-	-
Фильтрат дрожжей (сахараза), кап	-	-	5	5
Крахмал 1%, кап	10	-	10	-
Сахароза	-	10	-	10
Термостат, 37 °C, 10 мин				
Реакция Фелинга (по 5 кап раствора из каждой пробирки + 3 кап реактива Фелинга, кипятить 1 мин) окраска				
Вывод				

Работа 10. Исследование свойств тирозиназы из картофеля.

Тирозиназа - фермент, окисляющий аминокислоту тирозин в темный пигмент за счет кислорода. Этот фермент может окислить и гваяковую смолу. При окислении гваяковой смолы образуется озонид синего цвета.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Гваяковая смола. 2. Срезы сырого картофеля. 3. Срезы вареного картофеля

	Срез сырого картофеля	Срез вареного картофеля
Гваяковая настойка, кап.	1	1
Результат		
Вывод		

Работа 11. Ингибирующее действие хлорид-ионов на дегидрогеназный комплекс картофеля.

Хлорид-ионы ингибируют дегидрогеназный комплекс и срез картофеля остается без изменений, остальные темнеют.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. NaCl, крист. 2. NaI, крист. 3. KClO₃, крист. 4. Сырой картофель.

Срезы Картофеля	Посыпать Порошком	Результат, Окраска (через 15-20 мин)	Вывод
1	-		
2	NaCl		
3	NaI		
4	KClO ₃		

Работа 12. Определение активности амилазы крови с помощью метода «сухой химии» в сочетании с рефлотметрией.

Под сухой химией понимается процедура, когда реагенты, необходимые для химического анализа, наносятся в определенных пропорциях на бумагу или пленку, высушиваются и стабилизируются. После введения точного объема образца крови, сыворотки или плазмы реагенты вновь активируются и химическая реакция протекает так же, как и в «жидкой» химии. Изменения окраски продуктов реакции регистрируются с помощью отражательного фотометра (рефлектофотометра, рефлотрона). Таким образом, для реализации метода сухой химии необходимы два основных компонента системы: тест-полоски и рефлотрон.

Тест-полоски имеют довольно сложное строение. В верхней части полоски находится многослойная структура, причем наружный слой состоит из стекловолокна. Здесь происходит отделение сыворотки крови от форменных элементов. Сыворотка распределяется равномерно и проникает в следующие слои, содержащие химические реагенты. Эти реагенты отделены друг от друга и стабилизированы в сухой форме. Благодаря этому тест-полоски могут храниться до года при комнатной температуре. По мере проникновения сыворотки крови через слои реагентов осуществляется заданная химическая реакция. Измерение интенсивности возникшей окраски осуществляется в рефлотроне и результат представляется в избранных единицах на табло. В нижней части тест-полоски находится магнитная лента. Она содержит информацию для управления рефлотроном: название измеряемого параметра, время отделения плазмы, время протекания реакции, длина волн света для регистрации, факторы пересчета, единицы измерения, калибровка. Весь процесс управления ходом анализа осуществляется микропроцессором рефлотрона.

Принцип:

α-амилаза

Индолил-α,D-мальтогептаозид → индоксил + глюкоза

α-глюкозидаза

Индоксил + 2-метокси-4-морфолинофенил-дiazонийтетрахлороцинкат →

красно-фиолетовое окрашивание

Нормальные значения активности в крови, сыворотке, плазме

37 °С	30 °С	25 °С
< 220 Е/л	< 160 Е/л	< 120 Е/л

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.

Капиллярная кровь, сыворотка или плазма

ХОД РАБОТЫ

1. Включить прибор.
2. Вынуть тест-полоску из вials.
3. Удалить защитную фольгу.
4. Нанести 32 мкл исследуемого образца с помощью пипетки для рефлотрона в центр красной аппликационной зоны тест-полоски "Amylase" (наконечник пипетки не должен соприкасаться с тест-полоской).
5. В течение 15 секунд вставить полоску в рефлотрон (надпись "AMYL" показывает, что полоска правильно вставлена и специфический магнитный код прочитан прибором).
6. Прочитать результат через время, указанное на дисплее прибора (в секундах).
7. Открыть приемное отделение рефлотрона и удалить использованную полоску.

Работа 13. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по гидролизу β -глицерофосфата (метод Боданского), УИРС.

Активность щелочной фосфатазы в норме равна 0,5-1,3 ммоль/ч·л, а кислой фосфатазы – 0,06-0,13 ммоль/ч·л. Принцип определения активности фосфатаз основан на способности ферментов отщеплять неорганический фосфат от β -глицерофосфата. Для определения активности щелочной фосфатазы используют щелочной раствор β -глицерофосфата, для кислой – кислый раствор β -глицерофосфата.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Щелочной раствор β -глицерофосфата, 5 г/л, рН 8,6.
2. Кислый раствор β -глицерофосфата, 5 г/л, рН 5,0.
3. Раствор молибденовокислого аммония, 25 г/л (в 2,5 н растворе серной кислоты).
4. Раствор трихлоруксусной кислоты, 100 г/л.
5. Рабочий стандартный раствор фосфора (содержит 0,01 мг фосфора в 1 мл).
6. Раствор аскорбиновой кислоты, 10 г/л (в 0,1 н растворе HCl).

ХОД РАБОТЫ

В центрифужную пробирку с надписью $\Pi_{щ}$ внести 1 мл щелочного раствора, в пробирку с надписью $\Pi_{к}$ - 1 мл кислого раствора β -глицерофосфата и поместить их на 5 мин в термостат при 37 °С для прогревания субстратов. Затем осторожно, избегая образования пузырьков воздуха, в пробирки внести по 0,1 мл сыворотки крови и полученную фермент-субстратную смесь инкубировать в течение 1 ч при 37 °С. Время термостатирования опытных проб использовать для определения содержания

неорганического фосфата в контрольных пробах. Для этого в центрифужные пробирки с надписью $K_{\text{ш}}$ и $K_{\text{к}}$ внести соответственно по 1 мл щелочного или кислого раствора β -глицерофосфата, прилить по 1,1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, после чего добавить по 0,1 мл той же сыворотки крови, пробы перемешать и через 5 мин центрифугировать в течение 10 мин при 3000 об/мин. Затем отобрать по 1,5 мл центрифугата и перенести в обычные пробирки с соответствующей маркировкой ($K_{\text{ш}}$ и $K_{\text{к}}$), прибавить по 1 мл молибденового раствора, 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, перемешать. Пробы выдерживают 10 мин при комнатной температуре, после чего их колориметрируют при красном светофильтре в кюветах шириной 5 мм. В качестве пробы сравнения используют дистиллированную воду. К опытным пробам после инкубации в термостате добавить по 1,1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешать и далее обработать и колориметрировать, как контрольные пробы. Активность щелочной и кислой фосфатаз рассчитывают, используя калибровочный график. Для построения калибровочной кривой готовят следующие растворы.

Реактивы	Номера пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Рабочий раствор P_n , мл	0,6	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
ТХУ, мл	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Вода, мл	5,9	5,3	4,1	2,9	1,7	0,5
Перемешать						
Отобрать в другие пробирки	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Молибденовый раствор, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Аскорбиновая кислота	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Содержание P_n (мг) в пробах	0,001	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010

Через 10 мин после прибавления аскорбиновой кислоты пробы колориметрировать при красном светофильтре в кювете шириной 5 мм против дистиллированной воды. При построении калибровочной кривой на оси абсцисс откладывать содержание P_n в пробах, а на оси ординат – величины оптической плотности. В качестве единицы масштаба взять 10 мм на 0,001 мг фосфора.

По калибровочной кривой рассчитать число мг P_n в опытных и контрольных пробах.

Активность щелочной фосфатазы = $(P_{\text{ш}} - K_{\text{ш}}) \cdot 1,47 \cdot 10^5 / 31$ ммоль/ч·л

Активность кислой фосфатазы = $(P_{\text{к}} - K_{\text{к}}) \cdot 1,47 \cdot 10^5 / 31$ ммоль/ч·л,

где $(P_{\text{ш}} - K_{\text{ш}})$ или $(P_{\text{к}} - K_{\text{к}})$ – количество P_n , которое освободилось при действии фосфатазы; $1,47 \cdot 10^5$ – коэффициент пересчета с 0,068 мл на 1 л сыворотки; 31 – масса 1 ммоль P_n (мг).

Работа 14. Качественные реакции на витамин А.

Витамин А при взаимодействии с серной кислотой окрашивается в красно-фиолетовый или красно-бурый цвет, при взаимодействии с хлорным железом - в желто-зеленый цвет.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Масляный раствор ретинола ацетата, 34,4 г/л. 2. Серная кислота концентрированная. 3. Хлороформ. 4. Треххлористая сурьма, 23% хлороформный раствор.

ХОД РАБОТЫ

Реакция на витамин А с концентрированной серной кислотой. В сухую пробирку внести 1 каплю раствора ретинола ацетата и 5 капель хлороформа, перемешать и добавить 1 каплю концентрированной серной кислоты. Отметить результат реакции.

Реакция на витамин А с хлорным железом. В сухую пробирку внести 1 каплю ретинола ацетата и 5 капель хлороформа. Перемешать, добавить 3 капли хлорида железа. Отметить результат реакции.

Реакция на витамин А с треххлористой сурьмой. В сухую пробирку вносят 1 каплю раствора ретинола ацетата и добавляют 2-3 капли 23% хлороформного раствора треххлористой сурьмы. При смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет.

Работа 15. Количественное определение витамина А в рыбьем жире.

Принцип метода. Метод основан на реакции витамина А с треххлористой сурьмой в присутствии уксусного ангидрида, в результате чего развивается синяя окраска. Интенсивность окраски, прямо пропорциональную количеству витамина А в пробе, определяют фотометрически.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Хлороформ. 2. Уксусный ангидрид. 3. Треххлористая сурьма, 23% раствор.

ХОД РАБОТЫ

Навеску рыбьего жира 2,5 г растворяют в хлороформе в мерной колбе на 25 мл. В кювету КФК помещают 0,4 мл хлороформного раствора рыбьего жира, прибавляют 1-2 капли уксусного ангидрида (для предотвращения появления мути) и 4 мл раствора треххлористой сурьмы. Через 10 с фотометрируют при 620 нм против раствора треххлористой сурьмы. Концентрацию витамина А в исследуемом растворе находят по калибровочному графику, на котором каждому значению найденной оптической плотности соответствует определенное содержание витамина А в 0,4 мл раствора. Построение калибровочного графика производится с помощью стандартизованного концентрата витамина А в рыбьем жире. Если содержание витамина А в 1 г концентрата 500 МЕ, то для приготовления первоначального раствора берут навеску 10 г и растворяют в хлороформе в мерной колбе на 50 мл. В 1 мл этого раствора содержится 100 МЕ витамина А. Из этого раствора готовят еще 5-6 разведений с таким расчетом, чтобы в

0,4 мл раствора содержалось от 20 до 70 МЕ витамина А. Это количество (0,4 мл) берут для определения оптической плотности раствора. Полученные данные оптической плотности используют для построения калибровочного графика, где на оси ординат наносят найденное значение оптической плотности для каждого разведения раствора, а на оси абсцисс – содержание витамина А в тех же растворах. Содержание витамина А в 1 г рыбьего жира вычисляют по формуле: $X = A \times 25 / 0,4 \times 2,5$, где X – содержание витамина А в 1 г рыбьего жира в МЕ, 0,4 – количество раствора в мл, взятое для определения, 25 – общий объем исследуемого раствора в мл, 2,5 – навеска рыбьего жира в г.

Работа 16. Качественные реакции на витамин Д.

Витамин Д при взаимодействии с анилиновым реактивом при нагревании окрашивается в красный цвет, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубую окраску.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Анилиновый реактив (15 частей и 1 часть концентрированной соляной кислоты). 2. Хлороформ. 3. Раствор брома в обезвоженном хлороформе в соотношении 1:60. 4. Масляный раствор эргокальциферола, 1,25 г/л.

ХОД РАБОТЫ

Реакция на витамин Д с анилином. В сухую пробирку внести 2 капли масляного раствора эргокальциферола, 10 капель хлороформа и 1-2 капли анилинового реактива, осторожно нагреть при постоянном помешивании. Отметить результат реакции.

Реакция на витамин Д с бромхлороформом. В сухую пробирку внести 2-3 капли раствора эргокальциферола и 2-4 капли раствора брома в хлороформе. Отметить полученный результат.

Работа 17. Обнаружение эргостерола в дрожжах.

Эргостерол по строению близок к холестерину и поэтому дают характерную для него реакцию с уксусным ангидридом и серной кислотой (синее или зеленое окрашивание).

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Дрожжи. 2. Хлороформ. 3. Уксусный ангидрид. 4. Серная кислота концентрированная

ХОД РАБОТЫ

Немного сухих дрожжей поместить в пробирку, добавить 15-20 капель хлороформа, встряхнуть. Полученный экстракт отфильтровать. К экстракту добавить 5 капель уксусного ангидрида и серной кислоты. Отметить результат реакции.

Работа 18. Качественная реакция на викасол.

Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Раствор цистеина, 0,25 г/л. 2. Раствор едкого натра, 100 г/л. 3. Раствор викасола, 0,5 г/л.

ХОД РАБОТЫ

К 5 каплям раствора викасола добавить равное количество раствора цистеина и 1 каплю раствора едкого натра. Отметить результат реакции.

Работа 107. Качественная реакция на витамин Е с азотной кислотой.

Принцип метода. Спиртовой раствор витамина Е в присутствии концентрированной азотной кислоты окисляется в хиноидное соединение, окрашенное в красный цвет.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛ

1. Витамин Е, 0,1 % спиртовой раствор. 2. Азотная кислота, концентрированная. 3. Сахароза в порошке.

ХОД РАБОТЫ

В сухую пробирку вносят 6 кап 0,1% спиртового раствора витамина Е, добавляют несколько крупинок сахарозы, осторожно по стенке пробирки прибавляют 10 кап концентрированной азотной кислоты и пробирку слегка встряхивают. Через 1-2 мин содержимое пробирки приобретает красное или желтовато-красное окрашивание.

Работа 19. Количественное определение витамина Е.

ХОД РАБОТЫ

В две пробирки наливают по 2,5 мл 0,1% спиртового раствора витамина Е; добавляют по 0,5 мл 70% раствора азотной кислоты и выдерживают в кипящей водяной бане 3 мин. Пробирки охлаждают и через 15 мин объем жидкости в каждой из них доводят абсолютным этанолом до 5 мл. После перемешивания определяют оптическую плотность в кювете шириной 10 мм при $\lambda = 470$ нм (синий светофильтр). Концентрацию витамина Е в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику. Для его построения используют спиртовой раствор α -токоферола, содержащего 100 мг витамина в 1 мл. 0,5 мл такого препарата растворяют абсолютным этанолом в колбочке емкостью 50 мл (в 1 мл будет содержаться 1 мг препарата). В 4 пробирки наливают по 0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 мл спиртового раствора витамина Е и доводят общий объем жидкости абсолютным спиртом до 2,5 мл в каждой пробирке. На основании данных оптической плотности растворов, содержащих разное количество витамина Е, строят калибровочный график (на оси ординат наносят значения оптической плотности, а на оси абсцисс – соответствующие концентрации витамина Е в 1 мл).

Работа 20. Количественное определение витамина С в хвое, шиповнике, картофеле, луке, молоке, капусте по методу Тильманса.

Принцип метода. Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на её способности окисляться 2,6-дихлорфенолиндофенолом в дегидроаскорбиновую кислоту. Определение проводится путём титрования

исследуемой жидкости 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, в условиях, предохраняющих аскорбиновую кислоту от разрушения (кислая среда). Одному мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 1 мл 0,001 н. аскорбиновой кислоты, т.е. 0,0005 ммоль аскорбиновой кислоты (или 0,088 мг аскорбиновой кислоты). Для расчета содержания аскорбиновой кислоты используют формулы:

$$\frac{0,088 \cdot a \cdot 50 \cdot 1000}{B \cdot 0,5} = X_{\text{мг / кг}} \text{ или } \frac{0,0005 \cdot a \cdot 50 \cdot 1000}{B \cdot 0,5} = X_{\text{ммоль / кг}}$$

где 0,088 (0,0005) – количество мг (ммоль) аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола ; а - количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование; б - общее количество вытяжки, мл; в - масса вещества в граммах, взятого для анализа; г- количество мл вытяжки, взятое для титрования; 1000 - коэффициент пересчета на кг продукта.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,001 н. 2. Раствор соляной кислоты, 20 г/л. 3. Сухой шиповник и хвоя. 4. Картофель. 5. Лук. 6. Молоко. 7. Капуста.

ХОД РАБОТЫ

Определение содержания витамина С в шиповнике или хвое. 0.5 г сухой хвои или шиповника тщательно растереть в фарфоровой ступке с 2 мл раствора соляной кислоты, перемешать и осторожно, без потерь (на палочке) через воронку перенести содержимое ступки в мерную колбу емкостью 50 мл. Ступку и пестик обмыть раствором соляной кислоты и промывную жидкость присоединить к общей порции вытяжки. Объем жидкости в мерной колбе довести дистиллированной водой до метки, колбу закрыть пробкой и содержимое её несколько раз перемешать. Небольшую порцию вытяжки отфильтровать через бумажный фильтр и фильтрат использовать для титрования. В 2 колбочки емкостью 50 мл отмерить по 2 мл вытяжки из шиповника или по 10 мл вытяжки из хвои (к вытяжке из шиповника добавить 8 мл раствора соляной кислоты). Содержимое колбочек титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

Определение содержания витамина С в картофеле.

5 г картофеля измельчить и растереть в фарфоровой ступке, приливая постепенно 1 мл соляной кислоты и 15 мл дистиллированной воды. Полученную массу слить в коническую колбочку. Ступку ополоснуть водой и слить по стеклянной палочке в колбу. Титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

Определение содержания витамина С в капусте. 1 г капусты взвесить, растереть в ступке с 2 мл соляной кислоты, прилить 8 мл воды и отфильтровать. Для титрования отмерить 2 мл фильтрата, добавить 10 капель соляной кислоты и титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

Определения содержания витамина С в молоке. К 10 мл молока добавить 10 капель соляной кислоты и 10 мл воды. Титровать раствором 2,6 дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

Определение витамина С в луке. 0,5 г лука взвесить и растереть в ступке с 2 мл соляной кислоты и 20 мл воды. Отфильтровать и титровать раствором 2,6 дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

Работа 21. Разделение модельной смеси водорастворимых витаминов методом тонкослойной хроматографии.

Принцип метода. Метод основан на способности жидкой фазы, продвигающейся по слою адсорбента (силикагель) перемещать компоненты разделяемой смеси с разными скоростями. Положение пятен разделяемых витаминов на хроматограмме характеризуют значением R_f .

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Подвижная фаза 1 (бензол-этанол-уксусная кислота-ацетон, 70:20:5:5). 2. Подвижная фаза 2 (бензол-этанол-уксусная кислота-ацетон 55:35:5:5). 3. Пластины силифол. 4. Смесь витаминов (тиамин, пиридоксол, аскорбиновая кислота, рибофлавин, никотиновая кислота) в 50% этаноле.

ХОД РАБОТЫ

В угол пластинки силифол на расстоянии 2 см от каждой стороны наносят раствор смеси витаминов по 5 мкл (3 мкг/мкл) растворов тиамин, аскорбиновой кислоты, никотиновой кислоты, 10 мкл (3 мкг/мкл) раствора пиридоксола. Проводят двумерную хроматографию. Для первого направления используют подвижную фазу 1, затем подсушивают и проводят разделение в перпендикулярном направлении подвижной фазой 2. (Замена этанола метанолом существенно улучшает качество разделения). Затем пластины высушивают и выявляют пятна витаминов в ультрафиолетовом свете, используя следующие значения R_f для тиамин, пиридоксола, витамина С, рибофлавина, никотиновой кислоты с подвижной фазой 1 - 0,00, 0,17, 0,48, 0,53, 0,68, а с подвижной фазой 2 – 0,00, 0,60, 0,16, 0,22, 0,44, соответственно.

Работа 22. Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение.

Принцип: фолиевая кислота хорошо растворима в 0,1 н. растворе NaOH. При экстрагировании фолиевой кислоты из дрожжей и ультрафиолетовом облучении наблюдается интенсивно голубая флюоресценция.

РЕАКТИВЫ, ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Едкий натр, 0,1 н и 0,005 н растворы. 2. Ледяная уксусная кислота. 3. Перманганат калия, 0,4%. 4. Перекись водорода, 3% раствор. 5. Индикаторная бумага. 6. Дрожжи.

ХОД РАБОТЫ

В ступку поместить 10 г дрожжей, добавить 10 мл 0,1 н раствора NaOH, 2 г кварцевого песка и растереть 5 мин. Затем центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин.

К 10 каплям надосадочной жидкости прилить 20 капель ледяной уксусной кислоты (pH 3,0) и приблизительно 10 капель 0,4% раствора KMnO_4 так, чтобы розовое окрашивание не исчезало в течение 10 минут. Через 10 минут удаляют избыток перманганата калия путем добавления 4-5 капель 3% раствора H_2O_2 и приливают 0,005 н раствор едкого натра (приблизительно 5 мл) до pH 4,0-4,5 в присутствии индикаторной бумаги. При ультрафиолетовом облучении фолиевой кислоты в щелочном растворе в флюороскопе наблюдается голубая флюоресценция.

Вопросы итогового контроля (зачет)

1. История биотехнологии.
2. Определение биотехнологии и ее задачи.
3. Что такое биогаз?
4. Экологическая биотехнология и ее задачи.
5. Биотрансформация ксенобиотиков и загрязняющих окружающую среду веществ.
6. Опишите основные этапы биотехнологического процесса.
7. Назовите некоторые из потенциальных возможностей, предоставляемых молекулярной биотехнологией.
8. Прокариоты и эукариоты.
9. Перечислите основные свойства *Escherichia coli*.
10. Перечислите основные свойства *S. cerevisiae*.
11. Каковы основные компоненты питательной среды?
12. Опишите особенности метаболизма у бактерий.
13. Биотехнологические особенности растительной клетки.
14. Биотехнология получения первичных и вторичных метаболитов.
15. Опишите принципы технологии рекомбинантных ДНК.
16. Охарактеризуйте рестриктазы и плазмиды.
17. Опишите способы введения рекомбинантных плазмид в *E. coli*.
18. Клонирование и экспрессия генов в различных организмах.
19. Получение инсулина на основе методов генной инженерии.
20. Каковы источники ферментов и методы их получения?
21. Имобилизованные ферменты и клетки в биотехнологии.
22. Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток.
23. Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов.
24. Изложите принцип метода ПЦР.
25. Изложите принцип метода ELISA.
26. Что такое геномная дактилоскопия?
27. Как используется альфа-амилаза в промышленном производстве этанола? Как повысить эффективность использования фермента?

28. Опишите достоинства и недостатки использования *Zymomonas mobilis* вместо *Saccharomyces cerevisiae* при производстве этанола. Как повысить эффективность промышленного использования *Zymomonas mobilis*?
29. Как с помощью генноинженерных методов модифицировать *Zymomonas mobilis*, чтобы можно было использовать этот микроорганизм для производства этанола из крахмала?
30. Взяв три штамма *Pseudomonas*, один из которых использует фенол в качестве единственного источника углерода при 0 °С, второй расщепляет антрацен с образованием катехола при 35 °С, а третий расщепляет п-толуол с образованием протокатехоата при 35 °С, предложите стратегию создания штамма, который сможет использовать в качестве единственного источника углерода фенол, антрацен или п-толуол при 0 °С.
31. Как повысить эффективность образования силоса, проводя манипуляции с *Lactobacillus plantarum*?
32. Как следует модифицировать бактерии рубца, чтобы они обеспечивали крупный рогатый скот незаменимыми аминокислотами?
33. Обсудите возможность создания рекомбинантных растений, способных фиксировать азот.
34. Каковы преимущества биологических инсектицидов перед химическими?
35. В чем различия между периодической ферментацией, периодической ферментацией с добавлением субстрата и непрерывной ферментацией?
36. Опишите основные виды биореакторов.
37. Опишите основные типы ферментации.
38. Почему Ti-плазмида из *Agrobacterium tumefaciens* подходит для создания вектора-переносчика чужеродного гена в хромосомную ДНК растения?
39. Предложите несколько стратегий создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям.
40. Опишите основные способы создания растений, устойчивых к гербицидам.
41. Какой подход вы применили бы для создания растения, толерантного к высоким концентрациям солей?
42. Как с помощью методов генной инженерии получить растения с необычной окраской цветков?
43. Как можно уменьшить действие окислительного стресса на растения?
44. Как молочная железа может быть использована в качестве «биореактора» для синтеза коммерческих продуктов?
45. Охарактеризуйте технологию получения продуктов питания из молока.

46. Как можно получить «безлактозное» молоко?
47. Охарактеризуйте технологию получения хлебопродуктов.
48. Опишите биотехнологические процессы, основанные на брожении.
49. Опишите технологию получения трансгенных животных.
50. Опишите контрольные процедуры для создания и производства вещества методами молекулярной биотехнологии.

Репозиторий ВГУ