

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН
КОСТАНАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ.
А.БАЙТУРСЫНОВА

Али М.М., Кухар Е.В., Атнабаев Ю.В.

ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

**Методические указания по выполнению
лабораторно-практических работ по дисциплине
«Объекты биотехнологии»**



КОСТАНАЙ, 2018

УДК 606
ББК 30.16
А 45

Авторы:

Али М.М. – преподаватель кафедры технологии производства продуктов животноводства КГУ им. А. Байтурсынова, м.т.н.

Кухар Е.В. – ассоциированный профессор кафедры микробиологии и биотехнологии КАТУ им. С.Сейфуллина, д.б.н.

Атнабаев Ю.В. – магистрант специальности 6М120100-Ветеринарная медицина КГУ им. А. Байтурсынова

Рецензенты:

Шапекова Н.Л. – д.м.н., профессор кафедры биотехнологии и микробиологии, декан факультета естественных наук ЕНУ им. Л.Н.Гумилева.

Коканов С.К. – к.в.н., начальник НИЦ КГУ им. А.Байтурсынова.

Сулейманова К.У. – к.б.н., профессор кафедры ветеринарной медицины КГУ им. А.Байтурсынова

Методические указания по выполнению лабораторно-практических работ по дисциплине «Объекты биотехнологии» составлены в соответствии с требованиями ТУП специальности и включают все необходимые сведения по освоению дисциплины и приобретению необходимых компетенций студентов специальности 5В070100-«Биотехнология» – Костанай: КГУ имени А.Байтурсынова, 2018. – 73 с.

Рассмотрено и рекомендовано методическим советом факультета ветеринарии и технологии животноводства КГУ им.А.Байтурсынова

Протокол №_____ от «_____» _____ 2018 г.

УДК 606
ББК 30.16

© Али М.М., Кухар Е.В., Атнабаев Ю.В.
© Костанайский государственный университет им.А. Байтурсынова, 2018 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Биологические объекты, используемые в биотехнологии.....	5
Устройство биотехнологической лаборатории.....	9
Прокариоты и эукариоты.....	13
Микроорганизмы и продукты их метаболизма как биотехнологические объекты.....	19
Вирусы и прионы.....	22
Бактерии. Их разнообразие и применение в биотехнологии.....	26
Высшие, низшие растения как объекты биотехнологии.....	30
Грибы, систематическое положение, распространение, биотехнологическое значение.....	35
Культура тканей и органов растений и животных как объекты биотехнологии.....	39
Каллусные и суспензионные культуры растений.....	42
Особенности получения иммобилизованных биообъектов и их применение в биотехнологии.....	45
Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии.....	52
Вещества биологического происхождения как объекты биотехнологии (ферменты).....	54
Вещества биологического происхождения как объекты биотехнологии (гормоны).....	60
Вещества биологического происхождения как объекты биотехнологии (нуклеиновые кислоты).....	64
ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	73

ВВЕДЕНИЕ

Последние два десятилетия характеризуются выдающимися достижениями биотехнологии, являющейся междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике.

Развитие биотехнологии позволяет существенно интенсифицировать производство, повысить эффективность использования природных ресурсов, решить экологические проблемы, создать новые источники энергии. Возможности биотехнологии при международном сотрудничестве специалистов могут быть направлены на решение мировых кризисных проблем, связанных с восполнением дефицита белка и энергии, предотвращением опасных заболеваний, охраной окружающей среды.

В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

- 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;

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

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

- 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;

- в медицине – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии.

В пособии представлен ряд задач практического плана, выполнение которых позволит студентам лучше ознакомиться с достижениями и разнообразными методами, используемыми в современной биотехнологии.

Лабораторная работа № 1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия: ознакомиться с биологическими объектами, используемые в биотехнологии.

Объекты, используемые в биотехнологии, чрезвычайно разнообразны по своей структурной организации и биологическим характеристикам.

К объектам биотехнологии относятся:

- вирусы;
- бактерии и цианобактерии;
- водоросли;
- лишайники;
- грибы;
- водные растения;
- клетки растений и животных.

Значение вирусов. Вирусы вызывают ряд опасных заболеваний человека (оспу, гепатит, грипп, корь, полиомиелит, СПИД, рак и т. д.), растений (мозаичную болезнь табака, томата, огурца, карликовость, увядание земляники), животных (чуме свиней, ящур).

Однако препараты соответствующих бактериофагов применяют для лечения бактериальных заболеваний – дизентерии и холеры. Получение интерферона – особого клеточного белка, препятствующего размножению вирусов, – широко используют в медицине, особенно во время вспышек эпидемий гриппа. Это вещество универсального действия, активное по отношению ко многим вирусам, хотя чувствительность разных вирусов к нему неодинакова. Будучи продуктом самой клетки, интерферон полностью лишен токсического воздействия на нее. Сейчас применяют готовый интерферон, его можно синтезировать в клетках, культивируемых вне организма.

Значение бактерий. Бактерии-сапрофиты играют большую роль в круговороте веществ в природе, разрушая в экосистемах мертвый органический материал. Хорошо известна их роль во всех биогеохимических циклах на нашей планете. Бактерии принимают участие в круговоротах химических элементов (углерода, железа, серы, азота, фосфора и др.), в процессах почвообразования, определяют плодородие почв. Многие бактерии «населяют» организмы животных и человека, стоят на страже здоровья. Биотехнологические функции, выполняемые бактериями, разнообразны. Их применяют при производстве различных веществ: уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых напитков и продуктов (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*), а также микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis*) и гербицидов, белков (*Methylomonas*), витаминов (*Clostridium* – рибофлавин); при переработке отходов, получении бактериальных удобрений, растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода. Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как

диазотрофность, т. е. способность к фиксации атмосферного азота. Благодаря быстрому росту и размножению, а также простоте строения, бактерии активно применяют в научных исследованиях по молекулярной биологии, генетике и биохимии, в генно-инженерных работах при создании геномных клонотек и введении генов в растительные клетки (агробактерии). Информация о метаболических процессах бактерий позволила производить бактериальный синтез витаминов, гормонов, ферментов, антибиотиков и др. Перспективными направлениями являются очистка с использованием бактерий почв и водоемов, загрязненных нефтепродуктами или ксенобиотиками, а также обогащение руд с помощью сероокисляющих бактерий.

Хозяйственное значение водорослей заключается в непосредственном использовании их в качестве пищевых продуктов или как сырья для получения различных веществ, ценных для человека. Из многочисленных видов водорослей съедобными в настоящее время считаются 80 (в основном это морские виды – ламинария, порфира, ульва, спирулина и т. д.). Съедобные водоросли богаты минеральными веществами, особенно йодом. Среди красных водорослей порфира считается деликатесом во многих приморских странах. В Японии насчитывается более 300 наименований блюд из морской капусты. Хлорелла содержит около 50% белка, а люцерна – лишь 18%. В целом в пересчете на 1 га хлорелла образует 20-30 т чистого белка, а люцерна – 4 2-3,5 т. Кроме того, хлорелла содержит: углеводы – 40%, жиры – 7-10%, витамины А (в 20 раз больше), В₂, К, РР и многие микроэлементы. Варьируя состав питательной среды, можно в клетках хлореллы сдвинуть процессы биосинтеза в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов. В клетках хлореллы содержится также антибиотик хлореллин. Водоросли служат кормом для рыб и водоплавающих птиц.

В ряде стран водоросли используют как витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Так, во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании и на Русском Севере водоросли прибавляют к селу или дают как самостоятельный корм коровам, лошадям, овцам, козам, домашней птице. Для этой цели строят заводы. Водоросли могут служить удобрением. В таком качестве их широко применяют в Ирландии, Шотландии, Норвегии, Франции. Запахивание биомассы водорослей обогащает почву фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов, а также пополняет почвенную азотфиксирующую микрофлору. При этом водоросли разлагаются в почве быстрее, чем навозные удобрения, и не засоряют ее семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов. Применение водорослевого перегноя и запахивание штормовых выбросов на 140-300% повышает урожайность не только злаковых культур (пшеницы, ячменя), но и овощей.

Значение лишайников. Лишайники настолько выносливы, что растут даже там, где отсутствует другая растительность, например, в Арктике и Антарктике. Они первыми заселяют безжизненные субстраты, в частности камни, и начинают почвообразовательный процесс, необходимый для освоения этой среды растениями. Ряд лишайников служит важным кормом для животных (например, ягель, или олений мох (*Cladonia rangiferina*), – корм северных оленей). При нехватке другой пищи его едят иногда и люди. Определенные виды лишайников считаются в Китае и Японии деликатесами. Из лишайников можно получать красители, в частности лакмус, экстрагируемый из видов рода *Rocella*. Лакмус до сих пор широко применяют в химических лабораториях для быстрого и простого определения реакции среды: в кислой среде он краснеет, а в щелочной синее. Другие лишайниковые красители в свое время использовали для окраски шерсти. Лишайники очень чувствительны к загрязнителям воздуха, особенно к диоксиду серы (сернистому газу). При этом степень чувствительности варьирует у разных видов, поэтому их используют в качестве биоиндикаторов степени загрязнения окружающей среды. Находят применение лишайники и в народной медицине, а выделяемые из них лишайниковые кислоты (усниновая кислота и др.) используют в качестве компонента лекарственных средств от ряда заболеваний, например кожных. Из некоторых лишайников (дубовый мох *Evernia prunastri* и др.) получают душистые вещества, применяемые в парфюмерии.

Значение грибов. Съедобные грибы (белые, сыроежки, грузди и др.) употребляют в пищу, но только после обработки. Наиболее ценный гриб – французский черный трюфель, для него характерен привкус прожаренных семечек или грецких орехов. Этот гриб является деликатесом. Он растет в дубовых и буковых рощах, главным образом в Южной Франции и Северной Италии. Искусственное выращивание съедобных грибов способно внести существенный вклад в дело обеспечения продовольствием все увеличивающегося населения земного шара. Необходимо сделать съедобные грибы такой же управляемой сельскохозяйственной культурой, как зерновые злаки, овощи, фрукты. Наиболее легко поддаются искусственному выращиванию древоразрушающие грибы. В пищевой промышленности различные дрожжевые культуры применяют в хлебопечении, для приготовления уксуса и спиртных напитков (вина, водки, пива, кумыса, кефира), а плесневые культуры – для изготовления сыров (рокфор, камамбер), соевого соуса (*Aspergillus oryzae*), а также некоторых вин (херес). Иногда грибы используют как источник галлюциногенов.

Грибы и препараты из них широко применяют в медицине. Некоторые виды грибов продуцируют важные вещества, в том числе антибиотики – пенициллы, стрептомицеты. В списке официальных препаратов содержатся многочисленные препараты из грибов, например из чаги, спорыньи. В восточной медицине используют цельные грибы – рейши (ганодерма), шиитаке и др.

Контрольные вопросы:

1. Перечислите основные виды объектов, используемые в биотехнологии.
2. Каково значение вирусов в биотехнологии?
3. Каково значение бактерии в биотехнологии?
4. Каково значение грибов в биотехнологии?
5. Какие виды водорослей используются в пищу?

Лабораторная работа № 2 УСТРОЙСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Цель занятия: Изучить основные принципы организации биотехнологической лаборатории; приобрести навыки работы в стерильных условиях; освоить основные приемы стерилизации посуды и инструментов.

Оснащение биотехнологической лаборатории

Биотехнологии имеют дело с культивированием вне организма (*in vitro*) клеток бактерий, дрожжей, растений и животных. Культивирование может быть осуществлено только в определенных стерильных условиях, для создания которых используют различные способы дезинфекции и стерилизации. Это в значительной степени определяет специфику устройства биотехнологической лаборатории.

В основном для работы с культурой клеток необходимо следующее:

1. Места для мытья, хранения посуды и приготовления сред.
2. Места для стерилизации посуды, инструментов, питательных сред, а также для стерильной пересадки клеточных культур.
3. Места для выращивания и поддержания культур клеток, основным требованием которых является постоянная температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Для освещения используются люминисцентные белые лампы.

Биотехнологическая лаборатория обычно снабжены следующим оборудованием:

1. Дистиллятором, рН-метром, техническими и аналитическими весами, вытяжным шкафом и др.
2. Лабораторной посудой: пробирками, чашками Петри, колбами, цилиндрами, пипетками градуированными, стаканами и др.
3. Набором инструментов: пинцетами, скальпелями, ножницами и др.
4. Приборами для стерилизации посуды, питательных сред, инструментов (автоклавом, сухожаровым шкафом, спиртовками) и создания стерильных условий для работы с культурой клеток и тканей (ламинар-боксом, ламинарным шкафом, УФ-боксом).
5. Термостатом, климатической камерой.
6. Биологическими микроскопами для исследования клеточных культур.
7. Необходимыми средствами пожарной и химической безопасности (огнетушителями, дезинфицирующими растворами и др.).

Подготовка биотехнологической лаборатории к работе

С целью создания оптимальных условий для работы с культурами клеток и тканей необходимо удалить микроорганизмы с поверхности различных предметов и воздуха помещения биотехнологической лаборатории. Для этого применяют различные способы дезинфекции.

Во-первых, регулярно проводят влажную уборку помещения лаборатории (пола, поверхностей стеллажей, шкафов, столов), оборудования для освобождения их от пыли и удаления с них значительной части микрофлоры. При этом могут быть использованы растворы различных

дезинфицирующих веществ, уничтожающих не только патогенные, но и сапрофитные бактерии. Соблюдают чистоту при хранении лабораторной посуды для работы с клеточными культурами.

Во-вторых, в лаборатории дезинфицируют воздух проветриванием и облучением ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм. Проветривание является наиболее простой формой дезинфекции воздуха. При продолжительном (не менее 30-60 мин) проветривании помещения лаборатории резко снижается количество микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между воздухом в помещении и на улице. Дополнительной мерой дезинфекции служат ультрафиолетовые лучи, обладающие высокой антимикробной активностью, вызывающие гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов. Ультрафиолетовые лучи обладают слабой проникающей способностью и легко поглощаются водой, стеклом и частицами пыли, поэтому их воздействие должно быть непосредственным и длительным от 30 минут до нескольких часов. В качестве источника ультрафиолета используют бактерицидные лампы (БУФ-15, БУФ-30), которые включают за 2-3 часа до начала работы. Необходимо помнить, что ультрафиолетовые лучи могут вызвать тяжелые поражения глаз, поэтому при работе с бактерицидными лампами нужно строго следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза. В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя.

Следует также учитывать, что при длительной непрерывной работе бактерицидной лампы интенсивность излучения снижается, поэтому целесообразно облучение вести с перерывами.

В-третьих, проводят дезинфекцию поверхности рабочего стола до начала работы и после ее окончания. Поверхность рабочего стола обычно дезинфицируют 70%-ным раствором этилового спирта, но можно использовать ультрафиолетовое облучение. При этом следует учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения. Этиловый спирт эффективен в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Его также применяют и для дезинфекции рук.

Правила работы в биотехнологической лаборатории

1. К работе в биотехнологической лаборатории допускаются только прошедшие инструктаж по технике безопасности.

2. Работать в лаборатории следует в халатах. Личные вещи оставляются в специально отведенных местах.

3. Перед началом и после окончания работы необходимо вымыть руки.

4. Во время работы в биотехнологической лаборатории следует соблюдать аккуратность. Небрежность, допущенная при проведении эксперимента, сводит к нулю все затраченные усилия, поэтому соблюдение чистоты на рабочем месте и правил работы в стерильных условиях гораздо важнее, чем изысканное специальное оборудование.

5. В лаборатории запрещается курить и принимать пищу.

Основные способы стерилизации лабораторной посуды и инструментов

Стерилизацию проводят с целью полного уничтожения всех живых микроорганизмов и спор внутри и на поверхности стерилизуемых предметов.

Сухожаровая стерилизация или стерилизация сухим горячим воздухом применяется для стерилизации стеклянной лабораторной посуды, металлических инструментов и др. Осуществляется в специальных сухожаровых стерилизаторах или сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации, в которых под действием сухого горячего воздуха при температуре 160-170°C на протяжении 1-2 часов погибают как клетки, так и споры микроорганизмов. Перед загрузкой в стерилизатор посуда должна быть тщательно вымыта и завернута в фольгу или оберточную бумагу для сохранения стерильности после прогрева. Колбы и пробирки должны быть закрыты ватными пробками. По окончании стерилизации открывать стерилизатор и извлекать стеклянную посуду можно только после того, как температура в стерилизаторе понизится до 80°C и менее, поскольку при резком охлаждении сильно нагретое стекло может треснуть.

Стерилизация насыщенным паром под давлением или автоклавирование является наиболее эффективным методом стерилизации и применяется для стерилизации лабораторной посуды, питательных сред, вспомогательных материалов и др. Осуществляется в специальных приборах – автоклавах, где одновременно под воздействием как высокой температуры пара (121°C), так и повышенном давлении пара (1,0 атм) сверх атмосферного в течение 15-45 мин погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов. Для автоклавирования посуду готовят так же, как и для сухожаровой стерилизации. Однако следует помнить, что во время стерилизации в автоклаве предметы увлажняются.

На практике проводят **контроль стерилизации**, при котором о работе стерилизующих приборов судят по гибели спор микроорганизмов, прямым изменениям температур, с помощью химических индикаторов.

Прокаливание (нагревание до красна) и обжигание в пламени применяются для стерилизации предметов из термостойких материалов, металлических инструментов (пинцетов, скальпелей, ножниц) непосредственно перед использованием. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени. В пламени погибают клетки и споры микроорганизмов. Чтобы не повредить клетки и ткани эксплантов инструменты после стерилизации необходимо охладить, прикасаясь к внутренней поверхности стенок чашки Петри или пробирки, и только после этого приступить к пересадке клеточных культур. На пламени также кратковременно обжигают стеклянные палочки, горлышки колб, пробирок, ватные пробки при разливе сред.

Кипячение является простейшим способом стерилизации и применяется для стерилизации металлических инструментов, мембранных фильтров. Проводится в специальных закрытых сосудах – стерилизаторах – в течение 30-60 минут в дистиллированной воде.

Контрольные вопросы:

1. Каким оборудованием обычно снабжена биотехнологическая лаборатория?
2. Назовите основные правила работы в биотехнологической лаборатории.
3. Чем отличается дезинфекция от стерилизации?
4. Какие основные способы термической и холодной стерилизации применяет в работе биотехнолог? В чем преимущества и недостатки каждого способа?
5. Какой способ применяются для стерилизации предметов из термоустойчивых материалов, металлических инструментов?

Лабораторная работа №3 ПРОКАРИОТЫ И ЭУКАРИОТЫ

Цель занятия: Ознакомиться с строением прокариотической и эукариотической клеток. Изучить основные органоиды. Рассмотреть отличительные характеристики прокариот и эукариот.

Форма и размеры клеток очень разнообразны. Несмотря на их многообразие, встречается лишь два типа структурной организации клеток. К одним относятся клетки бактерий, цианобактерий и археобактерий – это прокариоты (лат. *pro* – «перед», «раньше»; греч. *karion* – «ядро»). К другим относятся клетки грибов, растений и животных – это эукариоты (лат. *eu* – «полностью», «хорошо»; греч. *karion* – «ядро»).

Строение прокариотической клетки. Клетки прокариот имеют ядерное вещество и одну хромосому (кольцевую нить ДНК), но в них нет оформленного ядра. ДНК-содержащую зону в клетке прокариот называют нуклеоидом (лат. *nucleus* – «ядро»; греч. *eidos* – «вид»), т. е. похожим на ядро. Обычно нуклеоид находится в центре клетки, но он не ограничен мембранами от цитоплазмы.

Клетки прокариот отличаются очень малыми размерами (от 0,5 до 5 мкм) и простейшим строением (рисунок 1). Они имеют неподвижную цитоплазму, плазматическую мембрану и клеточную стенку. Цитоплазма содержит немного мелких рибосом и различные включения в виде гранул липидов и других веществ. Генетический материал (ДНК) не отделён мембранами от цитоплазмы, нет и оформленных хромосом, а «хромосомой» условно называют единственную кольцевую молекулу ДНК.

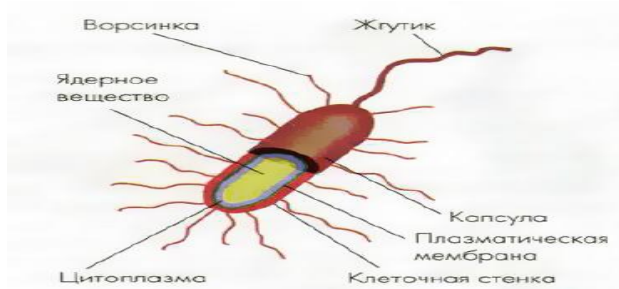


Рисунок 1 – Схема строения
клетки прокариот (бактерии)

Клеточная стенка – важный и обязательный структурный элемент большинства прокариотических клеток, располагающийся под капсулой или слизистым чехлом. Клеточная стенка придает клеткам определенную форму и служит механическим барьером между протопластом и внешней средой. На долю клеточной стенки приходится до 50% сухих веществ клетки.

У разных прокариот клеточная стенка имеет различное строение. У грамположительных бактерий она имеет толщину от 20 до 80 нм и плотно прилегает к цитоплазматической мембране. Основной структурный

компонент клеточной стенки – гликопептидмуреин. Муреин образует многослойный (до 10 слоев) каркас, прошитый белковыми мостиками. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий состоит из 1-2 слоев гликопептида (толщиной 2-8 нм), но сверху располагается наружная мембрана (толщиной 8-10 нм), состоящая из фосфолипидов, типичных для элементарных мембран. Наружная мембрана, как правило, имеет волнистую форму, поэтому в их клеточной стенке наблюдаются промежутки между гликопептидным слоем и наружной мембраной и между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной.

Мембраны. Цитоплазматическая мембрана у большинства прокариот – единственная мембрана клетки. Она способна образовывать различной формы многочисленные впячивания вовнутрь цитоплазмы – мезосомы. На них размещаются ферменты и фотосинтезирующие пигменты (у фототрофов). Мезосомы также участвуют в формировании перегородки при делении клетки и способствуют разделению ее содержимого на относительно обособленные отсеки, обеспечивая этим более благоприятные условия для протекания ферментативных процессов.

Цитоплазма прокариот неподвижна. Содержит набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболических реакций. В ней находятся генетический аппарат, рибосомы и включения разной химической природы и функционального назначения, например аэросомы (газовые вакуоли). Имеющийся в них газ аналогичен составу газов внешней среды. Аэросомы обычно встречаются у бактерий – обитателей водоемов. Наполненные газом вакуоли снижают удельный вес клетки и поддерживают ее во взвешенном состоянии. В цитоплазме хемо- и фотосинтезирующих бактерий присутствуют карбоксисомы с ферментами, способствующими фиксации углекислого газа в процессах фото- и хемосинтеза; гранулы с запасными питательными веществами – полифосфатами, полисахаридами; отложения серы и др. Прокариоты не имеют хлоропластов, но у них есть многочисленные тилакоиды – внутрицитоплазматические мембраны различной организации (пластинчатые, трубчатые и смешанного типа), на которых расположены фотосинтезирующие пигменты и переносчики электронов.

Рибосомы. Количество рибосом в клетке зависит от интенсивности процессов белкового синтеза и колеблется от 5 до 90 тыс. Общая масса рибосом может составлять примерно четверть всей клеточной массы, а количество рибосомной РНК (рРНК) – до 85% всей бактериальной РНК.

Генетический аппарат. Нуклеотид прокариот довольно четко ограничен от цитоплазмы, обычно занимает ее центральную область и представлен единственной нитью ДНК диаметром около 2 нм. Бактериальная ДНК (бактериальная хромосома) имеет форму замкнутого кольца. Генетическая информация клетки представлена также плазмидами – небольшими автономными фрагментами ДНК, размещенными в разных местах цитоплазмы. Плазмиды имеют большое значение в жизни бактерий,

так как обеспечивают их устойчивость к различным лекарственным препаратам. Большинство клеток бактерий не содержит гистонов, высокоспирализованную организацию участков хромосомы в них обеспечивают молекулы РНК.

У бактерий кольцевая хромосома нуклеотида прикреплена к цитоплазматической мембране в так называемой точке прикрепления. Во время деления клетки цитоплазматический белок образует клеточную перетяжку между реплицированными молекулами ДНК, благодаря которой клетки отделяются друг от друга, а расходящаяся мембрана «растаскивает» прикрепленные к ней реплицированные хромосомы по дочерним клеткам. Таким образом, при делении бактериальной клетки генетический материал также равномерно распределяется по дочерним клеткам, как и в результате митоза эукариот.

Строение эукариотической клетки. Клетки эукариот являются очень сложными единицами живой природы и характеризуются большим структурно-функциональным разнообразием (рисунок 2). При этом форма клеток часто зависит от выполняемых ими функций у многоклеточного организма. Однако общий план строения всех клеток эукариот обладает принципиальным сходством. В клетках эукариот присутствуют хорошо оформленное ядро, отграниченное от цитоплазмы оболочкой из двух мембран; хромосомы из длинных скрученных нитей ДНК; полный набор различных органоидов.

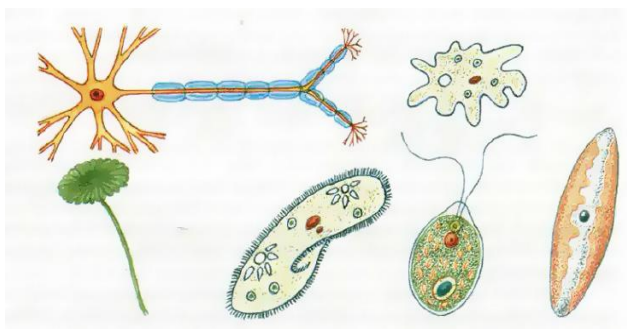


Рисунок 2 – Разнообразие форм клеток эукариот

Плазмалемма (клеточная оболочка) животных клеток образована мембраной, покрытой снаружи слоем гликокаликса толщиной 10-20 нм. Плазмалемма выполняет отграничивающую, барьерную, транспортную и рецепторную функции. Благодаря свойству избирательной проницаемости плазмалемма регулирует химический состав внутренней среды клетки. В плазмалемме размещены молекулы рецепторов, которые избирательно распознают определенные биологически активные вещества (гормоны). В пластах и слоях соседние клетки удерживаются благодаря наличию разного вида контактов, которые представлены участками плазмалеммы, имеющими особое строение. Изнутри к мембране примыкает кортикальный (корковый) слой цитоплазмы толщиной 0,1-0,5 мкм.

Различие клеток прокариот и эукариот особенно хорошо видно при сопоставлении их основных признаков (таблица 1).

Таблица 1 – Признаки клеток прокариот и эукариот

Признаки	Прокариоты	Эукариоты
Размер клеток	От 0,5 до 5 мкм	10-100 мкм
Дыхание	Аэробное или анаэробное	Аэробное
Генетический материал	Кольцевая ДНК находится в цитоплазме и ничем не защищена	Линейные молекулы ДНК, связанные с белками и РНК, образуют хромосомы внутри ядра
Синтез РНК и белка	И то и другое — в цитоплазме	Синтез РНК в ядре, а белка — в цитоплазме
Органоиды	Мало	Много
Мембранные органоиды	Клеточная (редко) и плазматическая	Много различных мембранных органоидов
Немембранные органоиды — рибосомы	Есть в цитоплазме	Есть в цитоплазме, в митохондриях и хлоропластах
Внутриклеточное переваривание	Нет	Есть
Деление клеток	Прямое деление надвое	Мейоз и митоз
Хромосомы	Одна кольцевая, содержит мало белка	Много линейных, содержат белок

Цитоплазма. В цитоплазме находится целый ряд оформленных структур, имеющих закономерные особенности строения и поведения в разные периоды жизнедеятельности клетки. Каждая из этих структур несёт определенную функцию. Отсюда возникло сопоставление их с органами целого организма, в связи с чем они получили название органеллы, или органоиды. В цитоплазме откладываются различные вещества - включения (гликоген, капли жира, пигменты). Цитоплазма пронизана мембранами эндоплазматической сети.

Эндоплазматическая сеть (ЭДС). Эндоплазматическая сеть - это разветвлённая сеть каналов и полостей в цитоплазме клетки, образованная мембранами. На мембранах каналов находятся многочисленные ферменты, обеспечивающие жизнедеятельность клетки. Различают 2 вида мембран ЭДС - гладкие и шероховатые. На мембранах гладкой эндоплазматической сети находятся ферментные системы, участвующие в жировом и углеводном обмене. Основная функция шероховатой эндоплазматической сети - синтез белков, который осуществляется в рибосомах, прикрепленных к мембранам. Эндоплазматическая сеть – это общая внутриклеточная циркуляционная

система, по каналам которой транспортируются вещества внутри клетки и из клетки в клетку.

Рибосомы осуществляют функцию синтеза белков. Рибосомы представляют собой сферические частицы диаметром 15-35нм, состоящие из 2 субъединиц неравных размеров и содержащие примерно равное количество белков и РНК. Рибосомы в цитоплазме располагаются или прикрепляются к наружной поверхности мембран эндоплазматической сети. В зависимости от типа синтезируемого белка рибосомы могут объединяться в комплексы - полирибосомы. Рибосомы присутствуют во всех типах клеток.

Митохондрии. Всеобщее распространение митохондрий в животном и растительном мире указывают на важную роль, которую митохондрии играют в клетке. Митохондрии имеют форму сферических, овальных и цилиндрических телец, могут быть нитевидной формы. Размеры митохондрий 0,2-1мкм в диаметре, до 5-7мкм в длину. Длина нитевидных форм достигает 15-20мкм. Количество митохондрий в клетках различных тканей неодинаково, их больше там, где интенсивны синтетические процессы (печень) или велики затраты энергии. Стенка митохондрий состоит из 2-х мембран - наружной и внутренней. Наружная мембрана гладкая, а от внутренней внутрь органоида отходят перегородки - гребни, или кристы. На мембранах крист находятся многочисленные ферменты, участвующие в энергетическом обмене. Основная функция митохондрий – синтез АТФ.

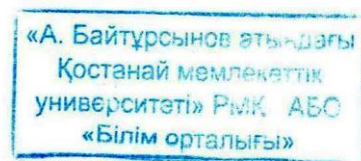
Ядро. Ядро - важнейшая составная часть клетки. Оно содержит молекулы ДНК и поэтому выполняет две главные функции:

- 1) хранение и воспроизведение генетической информации,
- 2) регуляция процессов обмена веществ, протекающих в клетке.

Клетка утратившая ядро, не может существовать. Ядро также неспособно к самостоятельному существованию. Большинство клеток имеет одно ядро, но можно наблюдать 2-3ядра в одной клетке, например в клетках печени. Известны многоядерные клетки с числом ядер в несколько десятков. Формы ядер зависят от формы клетки. Ядра бывают шаровидные, многолопастные.

Ядро окружено оболочкой, состоящей из двух мембран, имеющих обычное трёхслойное строение. Наружная ядерная мембрана покрыта рибосомами, внутренняя мембрана гладкая. Главную роль в жизнедеятельности ядра играет обмен веществ между ядром и цитоплазмой.

Содержимое ядра включает ядерный сок, или карิโอплазму, хроматин и ядрышко.



В состав ядерного сока входят различные белки, в том числе большинство ферментов ядра, свободные нуклеотиды, аминокислоты, продукты деятельности ядрышка и хроматина, перемещающиеся из ядра в цитоплазму. Хроматином называют глыбки, гранулы и сетевидные структуры ядра, интенсивно окрашивающиеся некоторыми красителями и отличные по форме от ядрышка. Хроматин содержит ДНК, белки и представляет собой спирализованные и уплотненные участки хромосом.

Ядрышко представляет собой плотное округлое тельце, располагающееся в ядерном соке. Число ядрышек колеблется от 1 до 5-7 и более. Ядрышки есть только в неделящихся ядрах, во время митоза они исчезают, а после завершения деления образуются вновь. Ядрышко не является самостоятельным органоидом клетки, оно лишено мембраны и образуется вокруг участка хромосомы, в котором закодирована структура рРНК. В ядрышке формируются рибосомы, которые затем перемещаются в цитоплазму.

Контрольные вопросы:

1. Признаком, по которому все живые организмы делятся на прокариот (безъядерных) и эукариот (ядерных) является?
2. Какие органоиды присутствуют в прокариотической клетке?
3. Какие органоиды присутствуют в эукариотической клетке?
4. В чем заключаются основные отличия эукариотической клетки от прокариотической?

Лабораторная работа №4
МИКРООРГАНИЗМЫ И ПРОДУКТЫ ИХ МЕТАБОЛИЗМА КАК
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

Цель занятия: Ознакомление с основными объектами большинства современных биотехнологических производств – микроорганизмами. Ознакомление с метаболическими возможностями микробных клеток и многообразием процессов катаболизма и анаболизма. Ознакомление с понятиями первичные и вторичные метаболиты.

В качестве объектов биотехнологии могут выступать клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты.

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов.

Мир микроорганизмов крайне разнообразен. В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных их видов. Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли). При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям.

Главным критерием при выборе биотехнологического объекта является способность синтезировать целевой продукт. Однако помимо этого, в технологии самого процесса могут закладываться дополнительные требования, которые порой бывают очень и очень важными, чтобы не сказать решающими.

Микроорганизмы должны:

- обладать высокой скоростью роста;
- утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты;
- быть резистентными к посторонней микрофлоре, т.е. обладать высокой конкурентоспособностью.

Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта. Конечно, в каждом конкретном случае ведущим является какой-то один из этих критериев, поскольку в природе устроено так, что во всем получить выигрыш не удастся никогда.

1. Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее, это присуще не всем микроорганизмам.

Существуют такие из них (например, олиготрофные), которые растут крайне медленно, однако они представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света. Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизируют CO_2 , а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т. е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако прогресса в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при $60-80^\circ \text{C}$. Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно не стерильном культивировании, т. е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5-2 раза выше, чем у мезофилов.

Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям, детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам. В то же время они малоактивны при обычных температурах. Так, протеазы одного из представителей термофильных микроорганизмов при 20°C в 100 раз менее активны, чем при 75°C . Последнее является очень важным свойством для некоторых промышленных производств.

Метаболизм – это совокупность биохимических процессов, протекающих в клетке и обеспечивающих ее жизнедеятельность. Клеточный метаболизм складывается из двух противоположно направленных процессов: энергетического метаболизма (катаболизма) и конструктивного метаболизма (анаболизма).

Энергетический метаболизм (катаболизм) – это совокупность реакций окисления различных восстановленных органических и неорганических соединений, сопровождающихся выделением энергии, аккумулируемой клеткой в форме фосфатных связей.

Конструктивный метаболизм (анаболизм) – это совокупность реакций биосинтеза, в результате которых за счет веществ, поступающих извне, и промежуточных продуктов (амфиболитов), образующихся при катаболизме, синтезируется вещество клеток. Этот процесс связан с потреблением

свободной энергии, запасенной в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях.

Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием. Это является результатом того, что бактерии в качестве источников энергии и углерода могут использовать самый широкий набор органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных периферических ферментов, или экзоферментов, относящихся к классу гидролаз, которые выделяются наружу и разрушают макромолекулы исходных субстратов до веществ с низкой молекулярной массой.

Образующиеся в результате действия таких ферментов вещества поступают в клетку бактерий и подвергаются действию ферментов промежуточного метаболизма. Эти ферменты называются эндоферментами, так как они локализуются внутри клетки. Эндоферменты, синтезируемые микроорганизмами, относятся ко всем известным классам ферментов – оксидоредуктазам, трансферазам, гидролазам, лиазам, изомеразам и др.

В метаболизме микроорганизмов различают первичные и вторичные метаболиты.

Первичные метаболиты необходимы для роста и размножения клеток и сходны у всех микроорганизмов.

Вторичные метаболиты возникают после остановки роста микроба (иногда и раньше) и могут различаться у разных организмов. Образование вторичных метаболитов зависит от состава среды и условий роста, а регуляция их биосинтеза отличается от регуляции синтеза первичных метаболитов. У вторичных метаболитов обычно более сложная молекулярная организация, чем у первичных.

Первичные продукты анаболизма, имеющие промышленную важность, – это липиды, витамины, биомасса, полисахариды и интермедиаты клеточного биосинтеза: нуклеотиды и аминокислоты. Из вторичных продуктов анаболического обмена наиболее важны антибиотики, алкалоиды, токсины.

Первичные продукты катаболического обмена – это этанол, уксусная кислота, CO_2 , АТФ. Вторичные продукты катаболизма – например, ацетон и бутанол.

Контрольные вопросы:

1. Какие микроорганизмы могут выступать в качестве объектов биотехнологии?
2. Что является главным критерием при выборе биотехнологического объекта?
3. Расскажите о перспективах использования фотосинтезирующих микроорганизмов. Продуцентами каких соединений они являются?
4. Что входит в понятие «метаболизм микроорганизмов»?
5. Какие продукты относятся к первичным, а какие к вторичным метаболитам?

Лабораторная работа №5

ВИРУСЫ И ПРИОНЫ

Цель занятия: Изучить особенности строения и жизнедеятельности вирусов и прионов. Рассмотреть ДНК- и РНК- содержащие вирусы. История возникновения прионных белков.

Впервые существование вирусов доказал русский ученый Дмитрий Иосифович Ивановский в 1892 году. Исследуя заболевания табака, он с помощью микробиологических фильтров пытался выделить возбудителя табачной мозаики.

От представителей других групп организмов вирусы отличаются отсутствием клеточного строения. Это внутриклеточные паразиты. Во внешней среде они не проявляют никаких признаков жизни. Только проникнув в клетки организмов определенного вида и взаимодействуя с их аппаратом синтеза белка, вирусные частички проявляют определенные признаки живого – способность к размножению. По этой причине вирусы считаются неклеточными формами жизни и объединяют в особое царство – Вира.

Строение вирусов. Каждая вирусная частичка состоит из оболочки, окружающей молекулу ДНК или РНК (в соответствии с этим вирусы называются ДНК- или РНК-содержащими). Вирусы нуклеиновой кислоты имеют разнообразный вид: одно- или двуцепочных спиралей, которые, в свою очередь, бывают линейными, кольцевыми или вторично скрученными. Молекула нуклеиновой кислоты несет наследственную информацию о строении вирусной частички.

Размеры вирусных частичек составляют от 15 до нескольких сотен, иногда – до 2 тысяч (некоторые вирусы растений) нанометров. Жизненный цикл вирусов состоит из двух фаз: внеклеточной и внутриклеточной.

Учитывая зависимость от структуры и химического состава оболочки вирусы делят на простые и сложные.

У простых вирусов оболочка состоит из однотипных белковых образований (субъединиц), образующих спиральные или многогранные структуры. Простые вирусы имеют разную форму – палочкообразную, нитчатую, шарообразную, и т.д.

Сложные вирусы покрыты дополнительной мембраной, состоящей из белков и липидов. Эта мембрана расположена над белковой оболочкой и представляет собой часть плазматической мембраны клетки-хозяина. Она может содержать соединения, служащие для распознавания специфических рецепторов на мембране клетки-хозяина и прикрепления к ней вирусной частички (оспа, гепатит В и т.д.). Иногда в мембране вируса содержатся ферменты, обеспечивающие синтез вирусных нуклеиновых кислот в клетке – хозяине и некоторые другие реакции.

Вирусные частички способны долгое время существовать вне организма хозяина и выдерживать влияние солнечных лучей, низкие или высокие температуры, а частички вируса гепатита В – даже кратковременное кипение. Вирус полиомиелита во внешней среде сохраняет способность к заражению хозяина в течение нескольких дней, а оспы – многих месяцев.

Внутри клетки – хозяина вирусные частички попадают по-разному. У многих сложных вирусов мембранные вирусные частички и клетки сливаются, как в вирусе гриппа. Часто вирусная частичка попадает внутрь клетки в результате пиноцитоза (полиомиелит).

Особый механизм проникновения внутрь клетки – хозяина у вирусов – паразитов бактерий, называемых бактериофагами (от греческих слов бактерион – папочка и фагос – пожирать). Частичка бактериофага представляет собой достаточно сложное образование. Она состоит из расширенной головки, содержащей ДНК, чехлообразного отростка с пустым стержнем внутри, напоминающим растянутую пружину, и хвостовых нитей. С помощью этих нитей вирус соединяется с рецепторными участками клетки – хозяина и прикрепляется к ее поверхности. Потом чехлообразный отросток сокращается, вследствие чего стержень проходит через оболочку бактерии и впрыскивает вирусную ДНК внутрь клетки. А пустая оболочка бактериофага остается снаружи.

Попав в клетку, вирусная нуклеиновая кислота передает наследственную информацию в разные участки аппарата, обеспечивающего синтез белка в клетке. Проникая в клетку, вирус вызывает в ней инфекционные процессы. Инфекция (от латинского слова *инфецере* – заражать, отравлять) – комплекс процессов, происходящих во время взаимодействия возбудителя (вирусы, бактерии, грибы) и организма хозяина. Подобные явления, к которым приводят паразитические животные (простейшие, плоские и круглые черви и т.д.), называются инвазией (от латинского слова *инвазио* – вторжение, нападение).

Вирусы играют определенную роль в природе. Так, они регулируют численность своих хозяев. Считается, что вирусы играют определенную роль в эволюции прокариотов, поскольку могут передавать наследственную информацию от одной бактериальной клетки к другой, как внутри одного вида, так и между разными видами, встраиваясь в ДНК клетки-хозяина.

В жизни человека вирусы играют преимущественно отрицательную роль. Они вызывают многие заболевания человека, домашних животных и культурных растений. У человека вирусы поражают органы дыхания (грипп), пищеварения (гепатит), нервную систему (энцефалит, бешенство), кожу и слизистые оболочки (герпес, корь, ветряная оспа), клетки разных систем органов (оспа, малярия), угнетают иммунные реакции (СПИД), приводят к некоторым видам раковых заболеваний. У домашних животных они вызывают ящур парнокопытных, энтерит и чумку собак, чуму кур и другие заболевания. Некоторые из них (ящур) опасны и для человека.

Кроме вирусов, существует и другой класс болезнетворных микроорганизмов – прионы.

Строение прионов. Прионы (от англ. *proteinaceous infectious particles* – белковые заразные частицы) – особый класс инфекционных агентов, чисто белковых, не содержащих нуклеиновых кислот, вызывающих тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных (т. н. «медленные инфекции»).

Прионный белок, обладающий аномальной трёхмерной структурой, способен прямо катализировать структурное превращение гомологичного ему нормального клеточного белка в себе подобный (прионный), присоединяясь к белку-мишени и изменяя его конформацию. Как правило, прионное состояние белка характеризуется переходом α -спиралей белка в β -слои.

Открытие прионов состоялось во второй половине XX века, когда врачи столкнулись с необычным заболеванием человека – постепенно прогрессирующим разрушением головного мозга, происходящим в результате гибели нервных клеток. Это заболевание получило название губчатой энцефалопатии. Похожие симптомы были известны давно, но наблюдались они не у человека, а у животных (скреппи овец), и долгое время между ними не находили достаточной обоснованной связи.

Новый интерес к их изучению возник в 1996 г., когда в Великобритании появилась новая форма заболевания, обозначаемая как «новый вариант болезни Крейтцфельдта-Якоба (nvCJD)».

Важным событием было распространение «коровьего бешенства» в Великобритании, эпидемия которого была сначала в 1992–1993 гг, а потом и в 2001 г охватила несколько европейских государств, но тем не менее экспорт мяса во многие страны не был прекращён. Заболевание связывают с использованием «прионизированной» костной муки в кормах и премиксах, изготовленной из туш павших или заболевших животных, возможно, и не имевших явных признаков заболевания.

Пути переноса причинного фактора болезни, механизмы проникновения прионов в организм и патогенез заболевания изучены пока недостаточно.

В 1997 г. американскому врачу Стенли Прузинеру была присуждена Нобелевская премия за изучение прионов.

Прионовые белки млекопитающих не сходны с прионовыми белками дрожжей по аминокислотной последовательности. Несмотря на это, основные структурные особенности у них общие. Вместе с тем, прион, отвечающий за коровье бешенство, обладает способностью передаваться от вида к виду. В ходе исследований мозговых тканей умерших от прионных инфекций животных было показано, что прионы не содержат нуклеиновых кислот, а представляют из себя белки. Одним из первых охарактеризованных прионных белков стал PrP (от англ. *prion-related protein* или *protease-resistant protein*) массой около 35 кДа. Известно, что PrP может существовать в двух конформациях – «здоровой» – PrP^C, которую он имеет в нормальных

клетках (С – от англ. *cellular* – «клеточный»), в которой преобладают альфа-спирали, и «патологической» – PrPSc, собственно прионной (Sc- от *scrapie*), для которой характерно наличие большого количества бета-тяжей. При попадании в здоровую клетку, PrPSc катализирует переход клеточного PrPC в прионную конформацию. Накопление прионного белка сопровождается его агрегацией, образованием высокоупорядоченных фибрил (амилоидов), что в конце концов приводит к гибели клетки. Высвободившийся прион, по-видимому, оказывается способен проникать в соседние клетки, также вызывая их гибель.

Контрольные вопросы:

1. Назовите год открытия вирусов.
2. Опишите строение вирусов.
3. В чем отличие ДНК-содержащих вирусов от РНК-содержащих?
4. Вирусы поражающие бактериальные клетки.
5. Опишите строение прионного белка.

Лабораторная работа №6

БАКТЕРИИ. ИХ РАЗНООБРАЗИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия: Рассмотреть строение и жизнедеятельность бактерий. Ознакомиться с размножением бактерий, изучить особенности метаболизма. Рассмотреть классификацию бактерий и значение в биотехнологическом производстве.

До конца 1970-х гг. термин «бактерия» служил синонимом прокариот, но в 1977 г. на основании данных молекулярной биологии прокариоты подразделили на царства архебактерий и эубактерий (собственно бактерий).

Строение бактерий. Подавляющее большинство бактерий (за исключением актиномицетов и нитчатых цианобактерий) одноклеточны. По форме клеток они могут быть шаровидными (кокки), палочковидными (бациллы, клостридии, псевдомонады), извитыми (вибрионы, спириллы, спирохеты), реже – звездчатыми, тетраэдрическими, кубическими, С- или О-образными. Обязательными клеточными структурами бактерий являются:

- нуклеоид;
- рибосомы;
- цитоплазматическая мембрана (ЦПМ).

Прокариоты, в отличие от эукариот, не имеют в цитоплазме обособленного ядра. Вся необходимая для жизнедеятельности бактерий генетическая информация содержится в одной двухцепочечной, ДНК (бактериальная хромосома), имеющей форму замкнутого кольца. Она в одной точке прикреплена к ЦПМ. ДНК в развернутом состоянии имеет длину более 1 мм. Бактериальная хромосома представлена обычно в единственном экземпляре, т. е. практически все прокариоты гаплоидны, хотя в отдельных случаях одна клетка может содержать несколько копий своей хромосомы. Деление хромосомы сопровождается делением клетки. Область клетки, в которой локализована хромосома, называется нуклеотидом; она не окружена ядерной мембраной. В связи с этим новосинтезированная РНК сразу доступна для связывания с рибосомами, т. е. процессы транскрипции и трансляции могут протекать одновременно. Ядрышка нет.

Помимо хромосомы, в клетках бактерий часто находятся плазмиды – замкнутые в кольцо небольшие молекулы ДНК, способные к независимой репликации. Они содержат дополнительные гены, необходимые лишь в специфических условиях. В них кодируются механизмы устойчивости к отдельным лекарственным препаратам, способности к переносу генов при конъюгации, синтеза веществ антибиотической природы, способности использовать некоторые сахара или обеспечивать деградацию ряда веществ. То есть плазмиды действуют как факторы адаптации. В некоторых случаях гены плазмиды могут интегрировать в хромосому бактерий.

Рибосомы прокариот отличаются от таковых у эукариот и имеют константу седиментации 70 S (у эукариот – 80 S).

С внешней стороны от ЦПМ находятся несколько слоев (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол), называемых клеточной оболочкой, а также поверхностные структуры (жгутики, ворсинки, пили).

У бактерий существует два основных типа строения клеточной стенки, свойственных грамположительным и грамотрицательным видам. Клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой гомогенный слой толщиной 20-80 нм, построенный в основном из пептидогликанамуреина с большим количеством тейхоевых кислот и небольшим количеством полисахаридов, белков и липидов. У грамотрицательных бактерий пептидогликановый слой неплотно прилегает к ЦПМ и имеет толщину лишь 2-3 нм. У разных групп прокариот имеются локальные выпячивания ЦПМ - мезосомы, выполняющие в клетке разнообразные функции и разделяющие ее на функционально различные части. Считается, что мезосомы принимают участие в делении бактерий. Когда на мембранах мезосом располагаются окислительно-восстановительные ферменты, они являются эквивалентами митохондрий клеток растений и животных. У фотосинтезирующих бактерий во выпячивания мембран вмонтирован пигмент - бактериохлорофилл. С его помощью и осуществляется бактериальный фотосинтез. Он окружен наружной мембраной, имеющей, как правило, неровную, искривленную форму.

С внешней стороны от клеточной стенки может находиться капсула - аморфный слой гидратированных полисахаридов, сохраняющий связь со стенкой. Слизистые слои не имеют связи с клеткой и легко отделяются, чехлы же не аморфны, а имеют тонкую структуру.

Многие бактерии способны к активному движению с помощью жгутиков - выростов цитоплазмы.

Размножение бактерий. Бактерии не имеют полового процесса и размножаются лишь равновеликим бинарным поперечным делением или почкованием. Для одной группы одноклеточных цианобактерий описано множественное деление (ряд быстрых последовательных бинарных делений, приводящих к образованию от 4 до 1000 новых клеток под оболочкой материнской клетки).

У прокариот может происходить горизонтальный перенос генов. При конъюгации клетка-донор в ходе непосредственного контакта передает клетке-реципиенту часть своего генома (в некоторых случаях - весь геном). Участки ЦНК донорной клетки могут обмениваться на гомологичные участки ДНК реципиента. Вероятность такого обмена значима только для бактерий одного вида.

Бактериальная клетка может поглощать и свободно находящуюся в среде ДНК, включая ее в свой геном. Данный процесс носит название трансформации. В природных условиях обмен генетической информацией протекает с помощью бактериофагов (трандукция). При горизонтальном переносе новых генов не образуется, однако осуществляется создание разных

генных сочетаний. Эти свойства бактерий очень важны для генетической инженерии.

Спорообразование у бактерий. Некоторые бактерии образуют споры. Их формирование характерно для особо устойчивых форм с замедленным метаболизмом и служит для сохранения в неблагоприятных условиях, а также для распространения. Споры могут сохраняться продолжительное время, не теряя жизнеспособности. Так, эндоспоры многих бактерий способны выдерживать 10-минутное кипячение при 100 °С, высушивание в течение тысячи лет и, по некоторым данным, сохраняются в жизнеспособном состоянии в почвах и горных породах миллионы лет.

Метаболизм бактерий. За исключением некоторых специфических моментов, биохимические пути, по которым осуществляется синтез белков, жиров, углеводов и нуклеотидов, у бактерий схожи с таковыми у других организмов. Однако по числу возможных биохимических путей и, соответственно, по степени зависимости от поступления органических веществ извне бактерии различаются. Часть бактерий может синтезировать все необходимые им органические молекулы из неорганических соединений (автотрофы), другие же требуют готовых органических соединений, которые они способны лишь трансформировать (гетеротрофы).

Классификация бактерий. Наибольшую известность получила фенотипическая классификация бактерий, основанная на строении их клеточной стенки. На основе этой классификации построен «Определитель бактерий Берги», девятое издание которого вышло в 1984-1987 гг. Крупнейшими таксономическими группами в ней стали четыре отдела: *Gracilicutes* (грамотрицательные), *Firmicutes* (грамположительные), *Tenericutes* (микоплазмы) и *Mendosicutes* (археи).

Значение бактерий. Бактерии-сапрофиты играют большую роль в круговороте веществ в природе, разрушая в экосистемах мертвый органический материал. Хорошо известна их роль во всех биогеохимических циклах на нашей планете. Бактерии принимают участие в круговоротах химических элементов (углерода, железа, серы, азота, фосфора и др.), в процессах почвообразования, определяют плодородие почв. Многие бактерии «населяют» организмы животных и человека, стоят на страже здоровья.

Биотехнологические функции, выполняемые бактериями, разнообразны. Их применяют при производстве различных веществ: уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых напитков и продуктов (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*), а также микробных инсектицидов

(*Bacillus thuringiensis*) и гербицидов, белков (*Methylomonas*), витаминов (*Clostridium* – рибофлавин); при переработке отходов, получении бактериальных удобрений, растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода. Широко используется такое свойство некоторых бактерий, как diazotrophy, т. е. способность к фиксации атмосферного азота.

Благодаря быстрому росту и размножению, а также простоте строения, бактерии активно применяют в научных исследованиях по молекулярной биологии, генетике и биохимии, в генно-инженерных работах при создании геномных клонотек и введении генов в растительные клетки (агробактерии).

Информация о метаболических процессах бактерий позволила производить бактериальный синтез витаминов, гормонов, ферментов, антибиотиков и др.

Перспективными направлениями являются очистка с использованием бактерий почв и водоемов, загрязненных нефтепродуктами или ксенобиотиками, а также обогащение руд с помощью сероокисляющих бактерий.

Нельзя забывать о том, что отдельные виды бактерий вызывают опасные заболевания у человека (чуму, холеру, туберкулез, брюшной тиф, сибирскую язву, ботулизм и др.), животных и растений (бактериозы).

Некоторые виды бактерий могут разрушать металл, стекло, резину, хлопок, древесину, масла, лаки, краски.

Контрольные вопросы:

1. Назовите основные органоиды клетки бактерии
2. Какие типы бактерий существуют?
3. Каким способом размножаются бактерии?
4. Какие бактерии являются спорообразующими?
5. Какое значение имеют бактерии в биотехнологии?

Лабораторная работа № 7

ВЫСШИЕ, НИЗШИЕ РАСТЕНИЯ КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия: рассмотреть высшие и низкие растения как объекты биотехнологии.

Высшие и низшие растения. Различные группы растений значительно отличаются по строению.

Низшие растения не имеют органов и тканей. Их тело – слоевище, или таллом. К низшим растениям относятся водоросли. Большинство из них обитают в водной среде. В этих условиях питание они получают, поглощая вещества всей поверхностью тела. Все или большая часть клеток этих растений находятся на свету и способны к фотосинтезу. Поэтому у них нет необходимости к быстрому перемещению веществ по организму. Клетки этих растений в большинстве случаев имеют однотипное строение.

В водной среде встречаются и другие фотосинтезирующие организмы. Это прежде всего цианобактерии, которые иногда называют сине-зелёными водорослями. Это прокариотические организмы, не являющиеся растениями.

Высшие растения имеют функционально различные органы, образованные специализированными клетками. В основном, они обитают на суше. Воду и минеральное питание они получают из почвы, а для осуществления фотосинтеза должны подниматься над её поверхностью, поэтому для таких растений необходимо перемещение веществ между частями организма (проводящая ткань) и механическая поддержка и опора наземно-воздушной среде (механическая и покровная ткани).

Наличие специализированных клеток, тканей и органов позволило им достигать больших размеров и освоить широкий набор сред обитания. Многие представители высших растений вторично вернулись в воду. В пресных водоёмах они составляют основную массу водной растительности.

Водоросли. Водоросли – наиболее древняя и разнородная группа организмов. Они обитают в водной среде, почве, на поверхности растений и в других местах. Большинство водорослей являются автотрофами, так как содержат хлорофилл и могут использовать солнечный свет, но нередко их зеленая окраска маскируется другими пигментами. Некоторые водоросли утратили способность к фотосинтезу и перешли на гетеротрофный тип питания.

Водоросли используются, в основном, для получения белка. Весьма перспективны в этом отношении и культуры одноклеточных водорослей, в частности высокопродуктивных штаммов рода *Chlorella* и *Scenedesmus*. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве добавки в рационы скота, а также в пищевых целях.

Одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата (Средняя Азия, Крым) в открытых бассейнах со специальной питательной средой. К примеру, за теплый период года (6-8 месяцев) можно

получить 50-60 т биомассы хлореллы с 1 га, тогда как одна из самых высокопродуктивных трав – люцерна дает с той же площади только 15-20 т урожая.

Хлорелла содержит около 50% белка, а люцерна – лишь 18%. В целом в пересчете на 1 га хлорелла образует 20-30 т чистого белка, а люцерна – 2-3,5 т. Кроме того, хлорелла содержит 40% углеводов, 7-10% жиров, витамины А (в 20 раз больше), В2, К, РР и многие микроэлементы. Варьируя состав питательной среды, можно процессы биосинтеза в клетках хлореллы сдвинуть в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов.

В пищу употребляют не менее 100 видов макрофитных водорослей как в странах Европы и Америки, так и особенно на Востоке. Из них готовят много разнообразных блюд, в том числе диетических, салатов, приправ. Их подают в виде засахаренных кусочков, своеобразных конфет, из них варят варенье, делают желе, добавки к тесту и многое другое. В магазине можно купить консервы из морской капусты – ламинарии дальневосточных или северных морей. Ее консервируют с мясом, рыбой, овощами, рисом, употребляют при приготовлении супов и др. Она наряду с микроводорослью хлореллой является самой популярной съедобной и кормовой водорослью.

Известны и другие съедобные макрофитные водоросли – ульва, из которой делают разные зеленые салаты, а также алария, порфира, родимения, хондрус, ундария и др. В Японии продукты, получаемые из ламинариевых, называют «комбу», и для того, чтобы их вкусно приготовить, существует более десятка способов.

В целом ряде стран водоросли используют как весьма полезную витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Их прибавляют к сену или дают как самостоятельный корм для коров, лошадей, овец, коз, домашней птицы во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании и на нашем Севере. Животным скармливают в виде добавки также биомассу выращиваемых микроводорослей (хлорелла, сценедесмус, дуналиелла и др.).

Гидролизаты белка зеленой водоросли *Scenedesmus* используются в медицине и косметической промышленности. В Израиле на опытных установках проводятся эксперименты с зеленой одноклеточной водорослью *Dunaliella bardawil*, которая синтезирует глицерол. Эта водоросль относится к классу равножгутиковых и похожа на хламидомонаду. *Dunaliella* может расти и размножаться в среде с широким диапазоном содержания соли: и в воде океанов, и в почти насыщенных солевых растворах Мертвого моря. Она накапливает свободный глицерол, чтобы противодействовать неблагоприятному влиянию высоких концентраций солей в среде, где она растет. При оптимальных условиях и высоком содержании соли на долю глицерола приходится до 85% сухой массы клеток. Для роста этим водорослям необходимы: морская вода, углекислый газ и солнечный свет. После переработки эти водоросли можно использовать в качестве корма для

животных, так как у них нет неперевариваемой клеточной оболочки, присущей другим водорослям. Они также содержат значительное количество β -каротина. Таким образом, культивируя эту водоросль, можно получать глицерол, пигмент и белок, что весьма перспективно с экономической точки зрения.

Наряду с кормами водоросли давно применяют в сельском хозяйстве в качестве удобрений. Биомасса обогащает почву фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов, пополняет также ее бактериальную, в том числе азотфиксирующую, микрофлору. При этом в почве водоросли разлагаются быстрее, чем навозные удобрения, и не засоряют ее семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов.

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является агар – полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Количество его доходит до 30-40% от веса водорослей (водоросли лауренция и грацилярия, гелидиум). Водоросли – единственный источник получения агара, агароидов, каррагинина, альгинатов.

Бурые водоросли являются единственным источником получения одних из самых ценных веществ водорослей – солей альгиновой кислоты, альгинатов. Альгиновая кислота – линейный гетерополисахарид, построенный из связанных остатков (3-Д-маннуриновой и α -L-гиалуроновой кислот.

Альгинаты применяются в народном хозяйстве. Это изготовление высококачественных смазок для трущихся деталей машин, медицинские и парфюмерные мази и кремы, синтетические волокна и пластики, стойкие к любой погоде лакокрасочные покрытия, не выцветающие со временем ткани, производство шелка, клеящих веществ исключительно сильного действия, строительных материалов, пищевые продукты отличного качества – фруктовые соки, консервы, мороженое, стабилизаторы растворов, брикетирование топлива, литейное производство и многое другое. Альгинат натрия способен поглощать до 300 весовых единиц воды, образуя при этом вязкие растворы.

Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением – шестиатомным спиртом маннитом, который применяют в пищевой промышленности, фармацевтике, при производстве бумаги, красок, взрывчатки и др. Бурые водоросли в ближайшее время планируется использовать для получения биогаза. Каллусные культуры макрофитных водорослей могут быть использованы далее в различных направлениях. В случае, если они получены от агарофитов, можно непосредственно получать из них агар. Каллусные культуры пищевых макрофитных водорослей, например, ламинариевых, могут в перспективе использоваться для получения белка, непосредственно идущего в пищу и в пищевые добавки, а также в корма сельскохозяйственным животным.

Высшие растения (порядка 300 000 видов) – это дифференцированные многоклеточные, преимущественно наземные организмы. В процессе дифференциации и специализации клетки растений группировались в ткани (простые – из однотипных клеток, и сложные – из разных типов клеток). Ткани, в зависимости от функции, подразделяют на образовательные, или меристемные (от греч. *meristos* – делимый), покровные, проводящие, механические, основные, секреторные (выделительные). Из всех тканей лишь меристематические способны к делению и за их счет образуются все другие ткани. Это важно для получения клеток, которые затем должны быть включены в биотехнологический процесс.

Клетки меристемы, задерживающиеся на эмбриональной стадии развития в течение всей жизни растения, называются инициальными, другие постепенно дифференцируются и превращаются в клетки различных постоянных тканей – конечные клетки. Любой вид растения может дать в соответствующих условиях неорганизованную массу делящихся клеток – каллус (от лат. *callus* – мозоль), особенно при индуцирующем влиянии растительных гормонов. Массовое производство каллусов с дальнейшей регенерацией побегов пригодно для крупномасштабного производства растений. Вообще каллус представляет собой основной тип культивируемой на питательной среде растительной клетки. Каллусная ткань из любого растения может длительно рекультивироваться. При этом первоначальные растения (в том числе и меристематические), дедифференцируются и деспециализируются, но индуцируются к делению, формируя первичный каллус.

Кроме выращивания каллусов удастся культивировать клетки некоторых растений в суспензионных культурах.

Важными биообъектами представляются также и протопласты растительных клеток. Методы их получения принципиально сходны с методами получения бактериальных и грибных протопластов.

Кроме культуры растительных клеток, применяется водный папоротник азолла. Он ценится как органическое азотное удобрение, так как растет в тесном симбиозе с сине-зеленой водорослью анабена. Это позволяет симбиотическому организму анабена-азолла накапливать много азота в вегетативной массе. Анабену-азоллу выращивают на рисовых полях перед посевом риса, что позволяет снижать количество вносимых минеральных удобрений.

Представители семейства рясковых (*Lemnaceae*) – самые мелкие и простые по строению цветковые растения, величина которых редко превышает 1 см. Рясковые – свободноживущие водные плавающие растения. Вегетативное тело напоминает лист или слоевище низших растений, поэтому до начала 18 века ряску относили к слоевищным растениям.

Рясковые (*Lemna minor*, *L. trisulca*, *Wolffia*, *Spirodela polyrrhiza*) служат кормом для животных, для уток и других водоплавающих птиц, рыб, ондатры. Их используют и в свежем, и в сухом виде как ценный белковый

корм для свиней и домашней птицы. Рясковые содержат много протеина (до 45% от сухой массы). 45% углеводов, 5% жиров и остальное – клетчатка.

Контрольные вопросы:

1. Одним из самых ценных продуктов, получаемый из красных водорослей является?
2. Чем отличаются высшие и низшие растения?
3. Где применяются водоросли?
4. Что относится к высшим растениям?
5. Какие виды водорослей вы знаете?

Лабораторная работа № 8

ГРИБЫ, СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Цель занятия: ознакомиться с общей характеристикой, распространением в природе, биотехнологическим значением грибов.

Грибы представляют собой обширную группу организмов, включающую около 100 тыс. видов. Это гетеротрофные организмы, лишенные хлорофилла. Минеральные вещества гриб способен усваивать из окружающей среды, однако органические вещества он должен получать в готовом виде. По способу питания грибы подразделяют на симбионты, сапрофиты, паразиты. Симбионты вступают во взаимовыгодные отношения с растениями в форме микоризы. При этом гриб получает от растений необходимые ему органические соединения (углеводы и аминокислоты), в свою очередь, снабжая растения неорганическими веществами и водой.

Строение грибов. Вегетативное тело большинства грибов – мицелий – представляет собой переплетение тонких ветвящихся нитей (гиф). Мицелий бывает неклеточный (лишен перегородок), представляющий собой как бы одну гигантскую клетку с множеством ядер, и клеточный, разделенный на клетки, содержащие одно или много ядер. Клеточная стенка грибов содержит до 80-90% полисахаридов, связанных с белками и липидами. Скелетные ее компоненты состоят из хитина или целлюлозы. Запасные продукты клеток грибов – гликоген, волютин, масло.

Размножение грибов. Грибы размножаются несколькими способами. Бесполое размножение может быть вегетативным и собственно бесполым. Под вегетативным размножением подразумевают почкование гиф или отдельных клеток (например, у дрожжей). Образующиеся почки постепенно отделяются, растут и со временем сами начинают почковаться. Собственно бесполое размножение осуществляется посредством спор и конидий, которые обычно образуются на специальных ветвях мицелия.

Классификация грибов. Классификация основных отделов царства грибов основана на способе их размножения.

Зигомицеты (*Zygomycota*) Это грибы с неклеточным мицелием или с небольшим количеством перегородок; у наиболее примитивных – в виде голого комочка протоплазмы – амебоида или в виде одной клетки с ризоидами. Основные представители: мукор, ризопус.

Аскомицеты, или сумчатые грибы (*Ascomycota*) Это грибы с многоклеточным гаплоидным мицелием, на котором развиваются конидии. Характерно образование сумок с аскоспорами – основными органами размножения. Аскомицеты представляют собой одну из самых многочисленных групп грибов, которая насчитывает более 32 тыс. видов (примерно 30% всех известных науке видов грибов). Их отличает огромное разнообразие – от микроскопических почкующихся форм до обладающих

очень крупными плодовыми телами грибов. Основные представители: хлебные дрожжи, пеницилл, аспергилл, спорынья, пецица, сморчок.

Базидиомицеты (*Basidiomycota*) Это грибы с многоклеточным (как правило, дикариотическим) мицелием. Для них характерно образование базидий, несущих базидиоспоры. Группа включает подавляющее большинство грибов, употребляемых человеком в пищу, а также ядовитые грибы и многие грибы – паразиты культурных и диких растений. Всего насчитывается свыше 30 тыс. видов базидиальных грибов. Основные представители: белый гриб, шампиньон, мухомор и т.д. Аско- и базидиомицеты часто объединяют в группу высших грибов.

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы (*Deuteromycota*) В эту гетерогенную группу объединены все грибы с членистыми гифами, но с неизвестным до настоящего времени половым процессом. Насчитывается около 30 тыс. видов несовершенных грибов.

Значение грибов. Съедобные грибы (белые, сыроежки, грузди и др.) употребляют в пищу, но только после обработки. Наиболее ценный гриб – французский черный трюфель, для него характерен привкус прожаренных семечек или грецких орехов. Этот гриб является деликатесом. Он растет в дубовых и буковых рощах, главным образом в Южной Франции и Северной Италии. Искусственное выращивание съедобных грибов способно внести существенный вклад в дело обеспечения продовольствием все увеличивающегося населения земного шара. Необходимо сделать съедобные грибы такой же управляемой сельскохозяйственной культурой, как зерновые злаки, овощи, фрукты. Наиболее легко поддаются искусственному выращиванию древоразрушающие грибы. В пищевой промышленности различные дрожжевые культуры применяют в хлебопечении, для приготовления уксуса и спиртных напитков (вина, водки, пива, кумыса, кефира), а плесневые культуры – для изготовления сыров (рокфор, камамбер), соевого соуса (*Aspergillus oryzae*), а также некоторых вин (херес). Иногда грибы используют как источник галлюциногенов.

Грибы и препараты из них широко применяют в медицине. Некоторые виды грибов продуцируют важные вещества, в том числе антибиотики – пенициллы, стрептомицеты. В списке официальных препаратов содержатся многочисленные препараты из грибов, например из чаги, спорыньи. В восточной медицине используют цельные грибы – рейши (ганодерма), шиитаке и др. Многие грибы способны к взаимодействию с другими организмами посредством своих метаболитов или прямо инфицируя их. Применение сельскохозяйственных пестицидных препаратов из некоторых грибов рассматривается как возможность управления размерами популяций вредителей сельского хозяйства, таких, как насекомые, нематоды. В качестве биопестицидов (препарат боверин) используют, например, энтомопатогенные грибы. Мухомор издавна применялся как инсектицид. Разнообразны и биотехнологические функции грибов. Их используют для получения таких продуктов, как: – лимонная кислота (аспергиллус); – гиббереллины и

цитокинины (физариум и ботритис); – каротиноиды (астаксантин, придающий мякоти лососевых рыб красно-оранжевый оттенок, вырабатывают грибы *Rhaffia rhodozima*); – белок (*Candida*, *Saccharomyces lipolitica*); – *Trichosporon cutaneum*, окисляющий многочисленные органические соединения, включая некоторые токсичные (например, фенол), играет важную роль в системах аэробной переработки стоков. Плесени также продуцируют ферменты, используемые в промышленности (амилазы, пектиназы и т. д.). Грибы принимают участие в образовании симбиотической микоризы с корнями высших растений. Гриб получает от дерева органические соединения, а сам делает воду и минеральные вещества доступными для поглощения и всасывания растением. Кроме того, гриб обеспечивает дерево большей поверхностью всасывания. Однако некоторые грибы оказывают и отрицательное воздействие. Так, отдельные представители плесневых грибов существенно снижают урожай сельскохозяйственных культур. Грибы-древоразрушители вызывают быструю деструкцию деревьев и древесных материалов, поэтому рассматриваются как патогенные. Известно большое количество разнообразных патогенных грибов, вызывающих заболевания растений, животных и человека.

Грибы сочетают в себе черты клеток растений и животных. Они имеют клеточное ядро и, как у растений, прочную клеточную стенку. Как клетки животных, они способны синтезировать полисахариды - хитин и гликоген и нуждаются в некоторых витаминах. Особенно интересны для биотехнологии микроскопические грибы - дрожжи, плесневые грибы, высшие грибы, применяемые в хлебопекарной, пивоваренной и молочной промышленности, а также для получения органических кислот, спиртов, антибиотиков, кормового белка, различных биологически активных веществ.

Биотехнологические функции грибов разнообразны. Их используют для получения таких продуктов, как: антибиотики (пенициллы, цефалоспорины); гиббереллины и цитокинины (фузариум и ботритис); каротиноиды (астаксантин, который придает мякоти лососевых рыб красно-оранжевый оттенок, вырабатывают *Rhaffia rhodozima*, добавляют в корм на рыбозаводах); белок (*Candida*, *Saccharomyces lipolitica*); сыры типа рокфор и камамбер (пенициллы); соевый соус (*Aspergillus oryzae*).

Из 500 известных видов дрожжей первым люди научились использовать *Saccharomyces cerevisiae*, этот вид наиболее интенсивно культивируется. К дрожжам, сбраживающим лактозу, относится *Kluyveromyces fragilis*, который используют для получения спирта из сыворотки. *Saccharomycopsis lipolytica* деградирует углеводороды и употребляется для получения белковой массы. Все три вида принадлежат к классу аскомицетов. Другие полезные виды относятся к классу дейтеромицетов (несовершенных грибов), так как они размножаются не половым путем, а почкованием. *Candida utilis* растет в сульфитных сточных водах (отходы бумажной промышленности).

Trichosporon cutaneum, окисляющий многочисленные органические соединения, включая некоторые токсичные (например, фенол), играет важную роль в системах аэробной переработки стоков. *Phaffia rhodozyma* синтезирует астаксантин - каротиноид, который придает мякоти форели и лосося, выращиваемых на фермах, характерный оранжевый или розоватый цвет. Промышленные дрожжи обычно не размножаются половым путем, не образуют спор и полиплоидны. Последним объясняется их сила и способность адаптироваться к изменениям среды культивирования (в норме ядро клетки *S.cerevisiae* содержит 17 или 34 хромосомы, т.е. клетки либо гаплоидны, либо диплоидны).

Плесени вызывают многочисленные превращения в твердых средах, которые происходят перед брожением. Их наличием объясняется гидролиз рисового крахмала при производстве сакэ и гидролиз соевых бобов, риса и солода при получении пищи, употребляемой в азиатских странах. Пищевые продукты на основе сброженных плесневыми грибами *Rhizopus oligosporus* соевых бобов или пшеницы содержат в 5 - 7 раз больше таких витаминов, как рибофлавин, никотиновая кислота) и отличаются повышенным в несколько раз содержанием белка. Плесени также продуцируют ферменты, используемые в промышленности (амилазы, пектиназы и т.д.), органические кислоты и антибиотики. Их применяют и в производстве сыров, например, камамбера и рокфора.

Искусственное выращивание грибов способно внести и иной, не менее важный вклад в дело обеспечения продовольствием возрастающего населения земного шара. Люди употребляют грибы в пищу с глубокой древности. Поэтому сделать грибы такой же управляемой сельскохозяйственной культурой, как зерновые злаки, овощи, фрукты, давно уже стало актуальной задачей. Наиболее легко поддаются искусственному выращиванию древоразрушающие грибы. Это связано с особенностями их биологии, которые стали нам известны и понятны только сейчас. Их способность легко расти и плодоносить использовали с древнейших времен.

Искусственное разведение древоразрушающих грибов получило довольно широкое распространение. Мицелий съедобных грибов можно выращивают на жидких средах, например на молочной сыворотке и др., в специальных ферментерах, в так называемой глубинной культуре.

Контрольные вопросы:

1. Какого вещества лишены грибы?
2. Какие продукты получают с использованием грибов?
3. Что относится к микроскопическим грибам?
4. Какие грибы наиболее легко поддаются искусственному выращиванию?
5. На чем основана классификация основных отделов царства грибов? Перечислите их группы.

Лабораторная работа № 9
КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ КАК
ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия: Рассмотреть культуру тканей и органов растений и животных как объекты биотехнологии.

Высшие растения (порядка 300 000 видов) – это дифференцированные многоклеточные, преимущественно наземные организмы. В процессе дифференциации и специализации клетки растений группировались в ткани (простые – из однотипных клеток, и сложные – из разных типов клеток). Ткани, в зависимости от функции, подразделяют на образовательные, или меристемные (от греч. *meristos* – делимый), покровные, проводящие, механические, основные, секреторные (выделительные). Из всех тканей лишь меристематические способны к делению и за их счет образуются все другие ткани. Это важно для получения клеток, которые затем должны быть включены в биотехнологический процесс.

Клетки меристемы, задерживающиеся на эмбриональной стадии развития в течение всей жизни растения, называются инициальными, другие постепенно дифференцируются и превращаются в клетки различных постоянных тканей – конечные клетки. Любой вид растения может дать в соответствующих условиях неорганизованную массу делящихся клеток – **каллус** (от лат. *callus* – мозоль), особенно при индуцирующем влиянии растительных гормонов. Массовое производство каллусов с дальнейшей регенерацией побегов пригодно для крупномасштабного производства растений. Вообще каллус представляет собой основной тип культивируемой на питательной среде растительной клетки. Каллусная ткань из любого растения может длительно рекультивироваться. При этом первоначальные растения (в том числе и меристематические), дедифференцируются и деспециализируются, но индуцируются к делению, формируя первичный каллус. Кроме выращивания каллусов удастся культивировать клетки некоторых растений в суспензионных культурах. Важными биообъектами представляются также и протопласты растительных клеток. Методы их получения принципиально сходны с методами получения бактериальных и грибных протопластов.

Кроме культуры растительных клеток, применяется водный папоротник азолла. Он ценится как органическое азотное удобрение, так как растет в тесном симбиозе с сине-зеленой водорослью анабена. Это позволяет симбиотическому организму анабена-азолла накапливать много азота в вегетативной массе. Анабену-азоллу выращивают на рисовых полях перед посевом риса, что позволяет снижать количество вносимых минеральных удобрений.

Представители семейства рясковых (*Lemnaceae*) – самые мелкие и простые по строению цветковые растения, величина которых редко

превышает 1 см. Рясковые - свободноживущие водные плавающие растения. Вегетативное тело напоминает лист или слоевище низших растений, поэтому до начала 18 века ряску относили к слоевищным растениям.

Рясковые (*Lemna minor*, *L. trisulca*, *Wolffia*, *Spirodela polyrhiza*) служат кормом для животных, для уток и других водоплавающих птиц, рыб, ондатры. Их используют и в свежем, и в сухом виде как ценный белковый корм для свиней и домашней птицы. Рясковые содержат много протеина (до 45% от сухой массы). 45% углеводов, 5% жиров и остальное - клетчатка и т.д. Они высоко продуктивны, неприхотливы в культуре, хорошо очищают воду и обогащают её кислородом. Это делает рясковые ценным объектом для морфогенетических, физиологических и биохимических исследований.

В качестве объектов биотехнологии могут использоваться сами животные и культуры клеток животных.

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 животных используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

Контрольные вопросы:

1. Как называются дифференцированные многоклеточные, преимущественно наземные организмы?
2. Какие ткани растений способны к делению и за их счет образуются все другие ткани?
3. Какими качествами обладают растения семейства Рясковые?
4. Чем сначала обрабатывают небольшой кусочек организма? и для чего это делают?
5. Сколько удастся переносить (перевивать, субкультивировать) и клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры?

Лабораторная работа №10

КАЛЛУСНЫЕ И СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ

Цель занятия: Ознакомление с основными типами культур клеток и тканей растений. Ознакомление с методикой искусственного получения каллусной культуры. Ознакомление с условиями культивирования клеточных суспензий и ролью суспензионных культур в биотехнологии.

В зависимости от способа, условий культивирования и происхождения можно выделить несколько типов культур клеток и тканей растений. Если культивирование происходит поверхностно на агаризованной питательной среде, то образуется каллусная ткань. Существует также суспензионная культура клеток, которую выращивают в жидкой питательной среде, так называемое глубинное культивирование.

Классическая каллусная культура, выращиваемая поверхностным способом, (первичный каллус) представляет собой аморфную, рыхлую массу сильно оводненных дедифференцированных клеток, не имеющую определенной анатомической структуры, цвет которой может быть белым, желтоватым, зеленым, красным. Такая рыхлая каллусная ткань легко распадается на небольшие группы клеток и кластеры и поэтому может быть использована для получения суспензионной культуры. Под влиянием фитогормонов клетки первичного каллуса могут претерпевать процессы вторичной (обратно) дифференцировки и органогенеза, что существенно сказывается на внешнем виде и консистенции (плотности) каллуса. Так каллусная культура средней плотности уже характеризуется хорошо выраженными меристематическими очагами. В ней легко иницируются процессы органогенеза. Наконец, у плотных каллусных тканей различают зоны редуцированного камбия и трахеидоподобных элементов, которые могут дать начало целым растениям.

В естественных условиях каллусная ткань может возникнуть у растений в результате механических повреждений. Она функционирует непродолжительное время, защищая растение в участке повреждения и накапливая питательные вещества для регенерационного процесса.

Методика искусственного получения каллусной культуры у растений хорошо отработана и не вызывает затруднений. Для того чтобы получить культуру ткани, из любой части растения (стебель, лист, элемента цветка, корень и т.д.), вычленивают эксплантат (кусочек ткани размером 0,5 - 1,0 см), стерилизуют его и помещают на питательную среду определенного состава.

Важнейшую роль в индуцировании каллусообразования на эксплантатах играет наличие в питательных средах специфических фитогормонов – ауксинов и цитокининов. Функции этих двух групп фитогормонов в каллусогенезе различны, но они тесно связаны между собой. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки и последующей вторичной дифференцировки клеток и подготавливают их к делению, а

цитокинины инициируют деление. Во время процесса дедифференцировки, который у всех клеток сходен, клетки должны утратить характерные, индивидуальные черты исходной ткани (потерять некоторые органеллы, в частности хлоропласты и некоторые запасные вещества, такие как крахмал, некоторые белки и липиды).

Различные типы фитогормонов, и, прежде всего их соотношение в среде культивирования, играют определяющую роль и во вторичной дифференцировке каллусных клеток.

Через несколько дней на изолированном кусочке ткани растения образуется первичный каллус. Периодически в асептических условиях его отделяют и переносят на свежую питательную среду для дальнейшего роста. Такую ткань можно поддерживать в культуре неограниченно длительное время, периодически расчленяя ее и пересаживая на свежую питательную среду. Рост пересаженных тканей происходит в контролируемых условиях при температуре 24-28°C.

Формирование каллуса длится обычно 1-2 месяца. Периодичность субкультивирования тканей зависит от скорости роста биомассы. Внешне такая ткань совершенно не похожа на растение, от которого она была получена, но ее клетки несут генетическую информацию, свойственную данному виду. Процессы, происходящие в культивируемых тканях, в принципе не отличаются от идущих в тканях целого растения. Сохранение способности к синтезу специфических вторичных метаболитов - алкалоидов, эфирных масел, карденолидов, стероидов и др. - определяет практическую ценность культур растительных тканей для создания технологий промышленного выращивания биомассы клеток в качестве принципиально нового вида лекарственного сырья. Кроме того каллусные клетки сохраняют свойство тотипотентности, что используется в технологии моноклонального размножения растений.

Другим вариантом культивирования растительных клеток является **суспензионная культура**, которую выращивают в жидкой питательной среде, по аналогии с процессом глубинного культивирования в промышленной микробиологии.

Культивирование клеток растений в жидкой среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием поверхностным способом каллусных культур. В условиях глубинного культивирования значительно легче контролировать метаболизм и рост клеточных популяций с помощью различного рода экзогенных факторов. Суспензионные культуры намного удобнее для биохимических и молекулярно-биологических экспериментов – изучения индукции ферментов, процессов экспрессии генов, изолирования и характеристик получаемых мутантов и т. п.

Клеточные суспензии образуются как из каллусных тканей, так и непосредственно из экспланта. Для получения суспензионных культур предпочтительнее брать каллусы рыхлого типа. Если для этой цели необходимо использовать плотный каллус, то его можно разрыхлить,

исключив из питательной среды соли Ca^{2+} . С этой же целью можно культивировать ткань на среде, содержащей ауксин 2-4-дихлорфеноксикусусную кислоту (2,4-D) или ферменты - пектиназу (0,2 мг/л) и целлюлазу (0,01 мг/л). Наилучший эффект достигается при добавлении ферментов. Суспензионные культуры клеток можно получить и непосредственно из экспланта по методу Ф. Стюарда. Для этого эксплант помещают в жидкую среду при постоянном автоматическом перемешивании. Дедифференцированные клетки отрываются от экспланта, образуя в питательной среде суспензию, состоящую из клеточных агрегатов различного состава. Качество суспензии определяется степенью агрегированности. Агрегаты должны содержать не более 10-12 клеток. Состояние клеточных суспензий характеризуется плотностью клеточной популяции. За 14 - 16 дней (средняя длительность культивирования) плотность обычно повышается от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Постоянное встряхивание - необходимое условие культивирования клеточных суспензий. Суспензионные клетки делятся в присутствии тех же двух групп гормонов (ауксинов и цитокининов), которые индуцируют деление клеток в каллусных тканях. Следовательно, можно сказать, что суспензионные культуры представлены разными агрегатами каллусных клеток.

Клеточные суспензии играют значительную роль в биотехнологии. Их культивируют в больших количествах для получения вторичных метаболитов, выявления новых веществ, для выращивания клеточной биомассы. Однако увеличение клеточной биомассы в результате деления клеток и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Поэтому необходимо хорошо знать физиологию, свойства клеток в суспензионных культурах, чтобы получить максимальный выход продукта.

Контрольные вопросы:

1. Какие типы культур клеток и тканей растений вы знаете?
2. В результате чего у растений в естественных условиях может возникнуть каллусная ткань?
3. Расскажите о методике искусственного получения каллусной культуры.
4. Какие фитогормоны играют важнейшую роль в индуцировании каллусообразования на эксплантатах? Расскажите о функциях этих фитогормонов.
5. Расскажите о методе получения суспензионных культур и о преимуществах культивирования клеток растений в жидкой среде.
6. Какую роль играют клеточные суспензии в биотехнологии?

Лабораторная работа №11

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИООБЪЕКТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия: Ознакомление с понятием иммобилизации, с преимуществами использования иммобилизованных клеток и ферментов в биотехнологии. Ознакомление с методами иммобилизации биообъектов. Ознакомление с практическим использованием иммобилизованных ферментов и клеток в различных направлениях биотехнологии.

Иммобилизованные клетки и ферменты, преимущества их использования в биотехнологии. Иммобилизация – физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, то есть биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты свободно обмениваются между биообъектом и растворителем.

Иммобилизация ферментов – это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ:

1. Такие ферменты представляют собой гетерогенные катализаторы, легко отделяющиеся от реакционной среды;
2. Могут использоваться многократно;
3. Обеспечивают непрерывность каталитического процесса.

Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65°C термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60%-м полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом.

Это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ:

- 1) отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов;
- 2) снижение затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- 3) более высокая активность и стабильность;
- 4) возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов;
- 5) способность к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Методы иммобилизации биообъектов.

Существуют два принципиально различных метода иммобилизации ферментов:

1. Без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы иммобилизации);

2. С образованием ковалентной связи между ними (химические методы иммобилизации). Каждый из этих методов осуществляется разными способами (рисунок 3).



Рисунок 3 – Методы иммобилизации ферментов

Физические методы иммобилизации ферментов реализуются посредством:

- 1.Адсорбции ферментов на нерастворимых носителях;
- 2.Путём включения энзимов в поры поперечно сшитого геля;
- 3.Включение ферментов в полупроницаемые структуры (инкапсулирование и включение ферментов в липосомы).

Адсорбция ферментов на нерастворимых носителях. При адсорбционной иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счёт электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей.

Адсорбция была первым методом иммобилизации ферментов (Дж. Нельсон, Э. Гриффин, 1916 г), но и сейчас не потеряла своего значения и стала широко распространённым способом получения ферментов в промышленности. В литературе описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием таких носителей, как кремнезём, активированный уголь, графитовая сажа, различные глины, пористое стекло, полисахариды, синтетические полимеры, оксиды алюминия, титана и других металлов. Последние применяются наиболее часто.

Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем при перемешивании. С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях. Активность фермента при таких условиях иммобилизации сохраняется практически на 100%, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя.

К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания фермента с носителем. При изменении условий иммобилизации может произойти десорбция фермента, его потеря и загрязнение продуктов. Существенно повысить прочность связывания

фермента с носителем может предварительная его модификация (обработка ионами металлов, полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида).

Иммобилизация ферментов путём включения в гель

Способ иммобилизации ферментов путём включения в трёхмерную структуру полимерного геля широко распространён благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но даже отдельных клеток. иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами:

1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включёнными в его ячейки молекулами фермента.

2. Фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние.

Для первого варианта используют гели: полиакриламида, поливинилового спирта, силикагеля. Для второго: гели крахмала, агар-агара, агарозы, фосфата кальция.

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объёме носителя. Все гели обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования фермента, включённого в его структуру.

Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры (1.инкапсулирование и 2.включение ферментов в липосомы)

Сущность этих способов иммобилизации заключается в отделении водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов, но задерживающей большие молекулы фермента. Разработано две модификации этого направления, которых представляют собой микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Метод инкапсулирования

Данный метод разработан Т. Чангом в 1974 г. и состоит в том, что водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции межфазной поликонсистенции двух соединений, одно из которых растворено с водой, а другое – в органической фазе. Размер получаемых капсул составляет сотни микрометров, а толщина мембраны - сотые доли микрометра.

Достоинство метода микрокапсулирования – простота, универсальность, возможность многократного использования нативного фермента, поскольку он может быть отделён от непрореагировавшего субстрата процедурой простого фильтрования. Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только

индивидуальные ферменты, но и целые клетки и отдельные фрагменты клеток.

К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Близким к инкапсулированию вариантом иммобилизации является метод включения водных растворов ферментов в липосомы, т. е. двойные липидные (жировые) шарики.

Впервые данный метод был применён для иммобилизации ферментов Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 году. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую плёнку липидов выдерживают в водном растворе, содержащем фермент. В процессе выдержки происходит самовпитывание (самосборка) липидных структур липосомы, содержащих данный раствор фермента. Ферменты, иммобилизованные путём включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и биотехнологических целях.

Химические методы иммобилизации ферментов. Представляют иммобилизацию ферментов путём образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

В отличие от физических вариантов, эти методы иммобилизации обеспечивают прочную и необратимую связь фермента с носителем и сопровождаются стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создаёт трудности в осуществлении каталитического процесса. Ферменты отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки, или спейсера), в роли которой чаще всего выступают полифункциональные агенты бромциан, гидразин, глутаровый диальдегид. В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединённые между собой ковалентными связями.

Применение иммобилизованных ферментов. Особенно ощутимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленности.

Для синтетической органической химии важно то, что в двухфазных реакционных средах фермент сохраняет каталитическую активность даже при исключительно малом содержании воды, поэтому равновесие катализируемой реакции (выход продукта) экспериментатор может регулировать в широких пределах, подбирая нужный органический растворитель. Иммобилизованные ферменты дали толчок к созданию принципиально новых методов "безреагентного" непрерывного анализа многокомпонентных систем органических (в ряде случаев и неорганических) соединений.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме.

Проблемы биоконверсии массы и энергии в настоящее время пытаются решить микробиологическим путем. Тем не менее, иммобилизованные ферменты вносят ощутимый вклад в осуществление фотолиза воды и в биоэлектрокатализ.

Заслуживает внимание и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Иммобилизованные ферменты могут использоваться и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента можно подействовать через носитель, подвергая последний ультразвуковой обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям. Это позволяет регулировать каталитическую активность системы фермент - носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии.

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены прежде всего в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L- аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.

В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, именно на этом пути медицину ждет создание новых высокоэффективных методов лечения.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов. В 70-х годах XX века появились первые публикации об иммобилизации клеток микроорганизмов, а первое промышленное применение иммобилизованных клеток было осуществлено в Японии в 1974 г. С их помощью получали аспарагиновую кислоту. Для иммобилизации могут быть использованы клетки в различном состоянии: живые и поврежденные в различной степени. Одностадийные реакции могут осуществлять и живые, и поврежденные клетки.

Методы иммобилизации клеток схожи с методами иммобилизации ферментов. Химический метод основан на образовании ковалентных связей с активированным носителем, на поперечной сшивке клеток за счет активных

групп в клеточной оболочке с бифункциональными реагентами (например, глутаровым альдегидом)

К физическим методам относятся адсорбция и агрегация.

Иммобилизация клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна основана на химических и физических взаимодействиях. Химические методы используются реже по сравнению с другими методами и малопригодны для иммобилизации живых клеток. Гораздо большее распространение получило включение клеток в состав гелей, мембран и волокон. При таком способе иммобилизации клетки могут сохранять жизнеспособность и в присутствии питательной среды размножаться в приповерхностных слоях гелей.

Биокаталитическая активность целых иммобилизованных клеток в настоящее время может быть использована в различных отраслях науки и техники:

- при биосинтезе и трансформации таких соединений, как аминокислоты, органические кислоты, антибиотики, стероиды углеводы, углеводороды, нуклеотиды и нуклеозиды;

- в пивоварении и виноделии;
- при очистке сточных и природных вод;
- при извлечении металлов из сточных вод;
- при ассимиляции солнечной энергии;
- при изготовлении водородных солнечных элементов;
- в азотфиксации;
- в аналитических целях при изготовлении электродов.

Наибольшее количество исследований по иммобилизации клеток микроорганизмов проведено японскими исследователями. Особые успехи были достигнуты ими в области синтеза аминокислот, органических кислот и антибиотиков. В Московском государственном университете был разработан метод получения аспарагиновой кислоты, который по эффективности не уступает японским. Клетки *E.coli*, включенные в армированный полиакриламидный гель, были с успехом использованы для получения аспарагиновой кислоты, период полужизни катализатора - 110 суток. Иммобилизовать можно не только клетки микроорганизмов, но и клетки растительных и животных тканей, используя их для синтеза физиологически активных соединений.

Интересные возможности открываются и при иммобилизации клеточных органелл как активных полиферментных систем. Все это свидетельствует о перспективности развития одного из направлений биотехнологии, связанного с изучением и применением иммобилизованных клеток.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение понятию иммобилизации, расскажите о преимуществах использования иммобилизованных клеток и ферментов в биотехнологии.

2. Перечислите методы иммобилизации биообъектов.
3. Какие методы иммобилизации ферментов относятся к физическим? Охарактеризуйте каждый из них.
4. Когда и кем был разработан метод инкапсулирования? В чем заключаются достоинства и недостатки данного метода?
5. Расскажите о сферах применения иммобилизованных ферментов и клеток.

Лабораторная работа №12
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ
ИНЖЕНЕРИИ

Цель занятия: Рассмотреть биообъекты усовершенствованные методами клеточной инженерии.

Клеточная инженерия – «насилованный» обмен участками хромосом у прокариот или участками и даже целыми хромосомами у эукариот. В результате создаются неприродные биообъекты, среди которых могут быть отобраны продуценты новых веществ или организмы с ценными в практическом отношении свойствами.

Перспективы клеточной инженерии заключаются прежде всего в том, что с ее помощью возможно получение межвидовых и межродовых гибридных культур микроорганизмов, а также гибридных клеток между отдаленными в эволюционном отношении многоклеточными организмами.

Первый этап работы связан с удалением у микроорганизмов клеточной стенки. Пептидогликан клеточной стенки может быть расщеплен с помощью ферментов (гидролаз пептидогликана), из которых самым известным является лизоцим. Удалить клеточную стенку и в тоже время сохранить целостность мембраны протопласта можно, лишь выровняв осмотическое давление внутри клетки и в среде.

При протопластировании: для получения протопластов клеточную стенку удаляют ферментативной обработкой в «гипертонической» среде с 20% раствором сахарозы или маннита, иногда с 10% раствором натрия хлорида в зависимости от определенных особенностей биообъекта и преследуемых целей.

Если биообъект принадлежит к микроскопическим (плесневым и дрожжевым) грибам, то для получения протопластов используют, как правило, не лизоцим, а комплексный ферментный препарат, выделенный из пищеварительного тракта виноградной улитки. Связано это с тем, что состав клеточной стенки у грибов более сложен, чем у бактерий.

Следующий этап работы состоит в объединении суспензий двух образцов протопластов, принадлежащих разным штаммам или разным видам, в более редких случаях – даже разным родам. Частота слияния резко повышается при добавлении к протопластам полиэтиленгликоля, обладающего свойствами детергента. Культуры таких клеток обладают новыми свойствами. В качестве примера можно привести получение «гибридных» антибиотиков.

Известно, что среди актиномицетов есть принадлежащие к разным видам продуценты антибиотиков гликозидной структуры с варьирующими агликонами и сахарами. Так, антибиотик эритромицин имеет 14-членный макроциклический агликон и два сахара (дезозамин и кладинозу), присоединенных к нему гликозидной связью, а у антибиотиков –

антрациклинов агликон состоит из четырех сконденсированных углеродных шестичленных колец, соединенных с аминсахаром.

С помощью клеточной инженерии были получены продуценты таких антибиотиков, у которых макролидный агликон эритромицина был связан с углеводной частью, соответствующей антрациклинам, и наоборот, антрациклиновый агликон с сахарами, свойственными эритромицину.

Контрольные вопросы:

1. Что такое клеточная инженерия?
2. Перспективы клеточной инженерии.
3. Опишите первый этап.
4. Что используют для получения протопластов, вместо лизоцима, если биообъекты принадлежит к микроскопическим (плесневым и дрожжевым) грибам?
5. Продуценты каких антибиотиков были получены с помощью клеточной инженерии?

Лабораторная работа № 13
ВЕЩЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ОБЪЕКТЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ (ФЕРМЕНТЫ)

Цель занятия: Ознакомление с понятием, определением и классификацией ферментов, с химическим составом и пространственной структурой ферментов. Ознакомиться с продуцентами ферментов. Изучить виды носителей для иммобилизации ферментов. Ознакомление с практическим использованием ферментов в различных отраслях народного хозяйства и направлениях биотехнологии.

Общие свойства ферментов

Ферменты имеют различные молекулярные массы от 12 до 1000 кДа. По типу общей структурной организации можно выделить несколько групп ферментов.

1. Ферменты, образованные одной полипептидной цепью (лизоцим).
2. Ферменты, образованные несколькими полипептидными цепями, соединенными дисульфидными мостиками (химотрипсин).
3. Олигомерные ферменты, образованные несколькими идентичными (мышечная фосфорилаза) или различными (аспартат-карбамоилтрансфераза из *E.coli*) субъединицами, связанными нековалентными связями.
4. Полифункциональные ферментные ансамбли; в таком ансамбле одна полипептидная цепь образует активные центры нескольких функционально связанных ферментов (в клетках млекопитающих первые три фермента пути биосинтеза пиримидинов – карбамоилфосфат-синтетаза, аспартат-карбамоилтрансфераза и дигидрооротаза образованы одной полипептидной цепью с молек. массой 2150 кДа).
5. Полиферментные комплексы. В состав таких комплексов, образованных за счет нековалентных взаимодействий, входит несколько индивидуальных ферментов; обычно эти ферменты функционально взаимосвязаны и катализируют серию последовательных реакций, например, пируватдегидрогеназный комплекс *E.coli* включает три фермента: пируватдегидрогеназный компонент, дигидролипоилтрансацилазу и дигидролипоилдегидрогеназу.

Ферменты являются высокоэффективными катализаторами; они способны увеличивать скорости реакций в 10^{10} раз. Так, например, уреазы (при pH 8,0) способна ускорять гидролиз мочевины в 10^{10} раз.

Классификация ферментов. Международный биохимический союз рекомендовал классификацию, в которой ферменты сгруппированы в 6 классов в соответствии с типом катализируемых реакций:

1. оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции);
2. трансферазы (реакции переноса функциональных групп);
3. гидролазы (реакции гидролиза);
4. лиазы (реакции отщепления групп негидролитическим путем);

5. изомеразы (реакции изомеризации);
6. лигазы (реакции синтеза за счет энергии АТФ).

В пределах классов ферменты группируются в подклассы и подподклассы в соответствии с особенностями катализируемых реакций; на этой основе (с учетом названия субстратов) базируется кодовая нумерация (шифры) ферментов и их систематические названия. Шифр фермента состоит из четырех разделенных точками чисел; первое число показывает, к какому из шести классов относится фермент; второе и третье числа показывают подкласс и под-подкласс, соответственно, а четвертое число - порядковый номер фермента в его под-подклассе.

Строение ферментов. Все ферменты по химической природе являются простыми или сложными белками с большой молекулярной массой (каталаза – 248000 Д, пируват-дегидрогеназа – 4500000 Д). При гидролизе образуют аминокислоты и, так же как и белки чувствительны к действию высоких температур, излучению, солям тяжелых металлов, концентрированных кислот и щелочей.

По строению ферменты могут быть однокомпонентными, простыми белками, состоящими только из аминокислот и двухкомпонентными, сложными белками. Во втором случае в составе фермента обнаруживается добавочная группа небелковой природы.

В разное время возникли различные наименования белковой части и добавочной группы в двухкомпонентных ферментах.

Чаще всего добавочную группу, прочно связанную, не отделяемую от белковой части (апофермента), называют простетической группой; в отличие от этого добавочную группу, легко отделяющуюся от апофермента и способную к самостоятельному существованию, обычно именуют коферментом (рисунок 4).

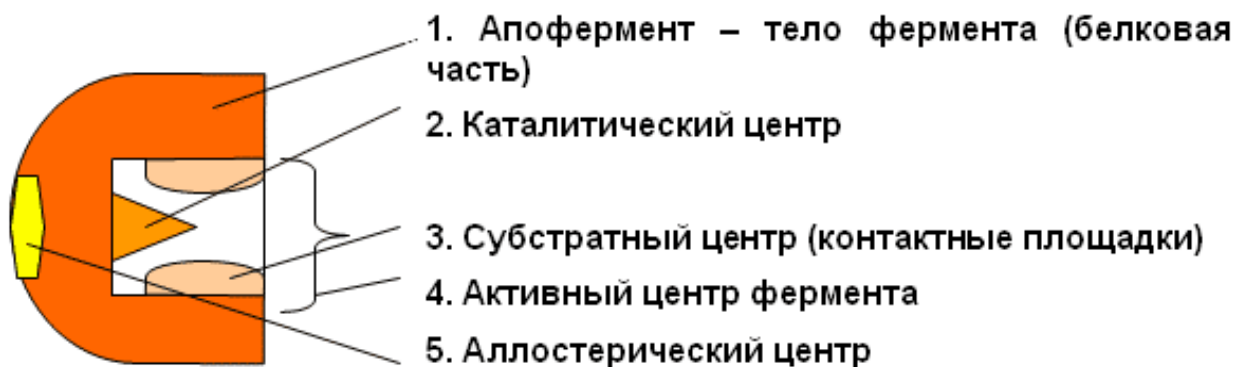


Рисунок 4 – Схема строения фермента

Химическая природа важнейших коферментов была выяснена в 30-е годы нашего столетия благодаря трудам О. Варбурга, Р. Куна, П. Каррера и др. Оказалось, что роль коферментов в двухкомпонентных ферментах играют большинство витаминов (Е, К, Q, В₁, В₂, В₆, В₁₂, С, Н и др.) или соединений, построенных с участием витаминов (коэнзим А, НАД⁺ и т. п.).

Применение ферментов. Обладая высокой степенью избирательности, ферменты используются живыми организмами для осуществления с высокой скоростью огромного разнообразия химических реакций; они сохраняют свою активность не только в микропространстве клетки, но и вне организма. Ферменты нашли широкое применение в таких отраслях промышленности, как хлебопечение, пивоварение, виноделие, чайное, кожевенное и меховое производства, сыроварение, кулинария (для обработки мяса) и т.д. В последние годы ферменты стали применять в тонкой химической индустрии для осуществления таких реакций органической химии, как окисление, восстановление, дезаминирование, декарбоксилирование, дегидратация, конденсация, а также для разделения и выделения изомеров аминокислот L-ряда (при химическом синтезе образуются рацемические смеси L- и D-изомеров), которые используют в промышленности, сельском хозяйстве, медицине. В настоящее время развивается новая отрасль науки – промышленная энзимология, являющаяся основой биотехнологии. Фермент, ковалентно присоединенный («пришитый») к любому органическому или неорганическому полимерному носителю (матрице), называют иммобилизованным. Разработаны проекты получения пищевых продуктов из целлюлозы, превращения ее с помощью иммобилизованных ферментов – целлюлаз – в глюкозу, которую можно превратить в пищевой продукт – крахмал. С помощью ферментной технологии в принципе можно также получить продукты питания, в частности углеводы, из жидкого горючего (нефти), расщепив его до глицеральдегида, и далее при участии ферментов синтезировать из него глюкозу и крахмал. В качестве примера иммобилизации ферментов и использования их в промышленности приводим схему непрерывного процесса получения аминокислоты аланина и регенерации кофермента (в частности, НАД) в модельной системе. В этой системе исходный субстрат (молочная кислота) подается при помощи насоса в камеру-реактор, содержащий иммобилизованные на декстране НАД⁺ и две НАД-зависимые дегидрогеназы: лактат- и аланиндегидрогеназы; с противоположного конца реактора продукт реакции – аланин – удаляется с заданной скоростью методом ультрафильтрации.

Иммобилизованными ферментами называют ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами: такие ферменты представляют собой гетерогенные катализаторы, легко отделяющиеся от реакционной среды; могут использоваться многократно; обеспечивают непрерывность каталитического процесса.

Кроме того, иммобилизация ведёт к изменению свойств фермента: субстратной специфичности; устойчивости; зависимости активности от параметров среды. Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65° стермоинактивация 3600 раз по сравнению с нативным

ферментом. Это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

Материалы (носители) для иммобилизации ферментов. По Дж. Порату (1974), идеальные материалы используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими свойствами:

- нерастворимостью;
- высокой химической и биологической стойкостью;
- значительной гидрофильностью;
- достаточной проницаемостью как для ферментов, так и для субстратов и продуктов реакции;
- способностью носителя легко активироваться.

В зависимости от природы носители делятся на органические материалы и неорганические материалы.

Органические полимерные носители можно разделить на 2 класса:

- а) природные;
- б) синтетические.

В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения.

Среди природных полимеров выделяют:

- белковые;
- полисахаридные;
- липидные носители.

А среди синтетических:

- полиметиленовые;
- полиамидные;
- полиэфирные носители.

К преимуществам природных носителей следует отнести: доступность; полифункциональность; гидрофильность, а к недостаткам – высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют: целлюлозу, декстран, агарозу и их производные. Для придания химической устойчивости их линейные цепи поперечно сшивают эпихлоргидрином.

Синтетические полимерные носители включают полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта, полиамидные и полиуретановые полимеры. Их преимущество: механическая прочность; возможность варьирования в широких пределах величины пор и введения различных функциональных групп. Синтетические полимеры воспроизведены в таких изделиях, как трубы, волокна, гранулы. Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов. Носители неорганической природы представляют собой материалы, изготовленные из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, а также силихромы и оксиды металлов. Основное преимущество неорганических носителей: лёгкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам

неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Практическое использование ферментов в различных отраслях народного хозяйства и направлениях биотехнологии. Ферменты в течение многих лет применяются в различных областях практической деятельности человека в кожевенной, пищевой, текстильной, фармацевтической и других отраслях промышленности, а также в медицине, сельском хозяйстве, химическом синтезе. Эффективность действия ферментов многократно выше по сравнению с химическими катализаторами, однако их промышленное применение затруднено из-за неустойчивости при хранении и температурных воздействиях. Кроме того, многократное применение ферментов практически невозможно в связи с технологическими трудностями их отделения от продуктов реакции. Многие непатогенные виды образуют ценные биологически активные вещества, нашедшие широкое применение на практике. В последние годы все большее значение они приобретают как продуценты разнообразных ферментов, нашедших применение в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, а также как продуценты пищевого и кормового белка.

На основе работ биохимиков, микробиологов и химиков создана отечественная промышленность антибиотиков и витаминов, нашедших широкое применение в медицине и в сельском хозяйстве. Созданы условия для развития промышленности ферментов, имеющих большое значение в медицине и ряде отраслей легкой, пищевой и химической промышленности. С помощью генетических методик получены и внедрены в производство высокоактивные продуценты антибиотиков. Это позволило значительно увеличить выход пенициллина, стрептомицина, тетрациклина и других антибиотиков.

Созданы условия для развития промышленности ферментов, имеющих большое значение в медицине и в ряде отраслей легкой, пищевой и химической промышленности. Если же отделить от микроорганизма ферменты целлюлазы, сконцентрировать их и добавить к целлюлозе, процесс значительно ускорится. При этом образующаяся глюкоза не потребляется грибами, а накапливается в реакционной смеси. Кроме того, если в качестве субстрата использовать не чистую целлюлозу, а целлюлозосодержащие отходы промышленности или сельского хозяйства, то можно решить и еще одну важную проблему – утилизацию отходов. Полученная глюкоза в зависимости от ее чистоты и экономической эффективности процесса может найти применение в медицине, пищевой промышленности, тонкой химической технологии или технической микробиологии. Глюкозу, как известно, можно сбраживать в этанол и затем употреблять как жидкое топливо в качестве заменителя части нефтепродуктов.

Наконец, дегидратация этанола дает этилен – основу современной большой химии. Обладая высокой степенью избирательности, ферменты используются живыми организмами для осуществления с высокой скоростью

огромного разнообразия химических реакций они сохраняют свою активность не только в микропространстве клетки, но и вне организма. Ферменты нашли широкое применение в таких отраслях промышленности, как хлебопечение, пивоварение, виноделие, чайное, кожевенное и меховое производства, сыроварение, кулинария (для обработки мяса) и т.д. В последние годы ферменты стали применять в тонкой химической индустрии для осуществления таких реакций органической химии, как окисление, восстановление, дезаминирование, декарбоксилирование, дегидратация, конденсация, а также для разделения.

Контрольные вопросы:

1. Дать определение и описать биологическую роль ферментов.
2. Классификация ферментов.
3. Опишите химический состав и пространственную структуру некоторых ферментов.
4. Назовите продуцентов ферментов среди тканей, органов, организмов.
5. Назовите виды носителей для иммобилизации ферментов и методы иммобилизации фермента с носителем.
6. Где используются ферменты в различных отраслях народного хозяйства и направлениях биотехнологии?

Лабораторная работа №14
ВЕЩЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ОБЪЕКТЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ (ГОРМОНЫ)

Цель занятия: Ознакомление с понятием, определением и классификацией гормонов, с химическим составом и пространственной структурой гормонов. Ознакомиться с продуцентами гормонов. Ознакомление с практическим использованием гормонов в различных направлениях биотехнологии.

Понятие, определение и классификация гормонов, химический состав и пространственная структура гормонов. Гормоны – биологически активные вещества органической природы, вырабатываемые в специализированных клетках желез внутренней секреции, поступающие в кровь и оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции. Сам термин «гормон» происходит от греческого слова «возбуждать». Это название точно отражает функции гормонов как катализаторов для химических процессов на клеточном уровне.

Первым открытым гормоном был секретин – вещество, которое производится в тонком кишечнике, когда его достигает пища из желудка.

В самых разных популярных текстах о здоровье можно встретить загадочное словосочетание «гормон удовольствия». Секретин нашли английские физиологи Уильям Бэйлисс и Эрнест Старлинг в 1905 году. Они же выяснили, что секретин способен через кровь «путешествовать» по всему организму и достигать поджелудочной железы, стимулируя ее работу.

А в 1920 году канадцы Фредерик Бантинг и Чарльз Бест выделили из поджелудочной железы животных один из самых известных гормонов – инсулин.

Основная часть гормонов производится в железах внутренней секреции: щитовидной и паращитовидных железах, гипофизе, надпочечниках, поджелудочной железе, яичниках у женщин и яичках у мужчин.

Есть также производящие гормоны клетки в почках, печени, желудочно-кишечном тракте, плаценте, тимусе в районе шеи и шишковидной железе в мозге.

Гормоны вызывают изменения в функциях различных органов в соответствии с требованиями организма.

Так, они поддерживают стабильность организма, обеспечивают его ответы на внешние и внутренние раздражители, а также контролируют развитие и рост тканей и репродуктивные функции.

Центр управления для общей координации производства гормонов находится в гипоталамусе, который примыкает к гипофизу у основания мозга.

Гормоны щитовидной железы определяют скорость протекания химических процессов в теле.

Гормоны надпочечников подготавливают организм к стрессу – состоянию «борьбы или бегства».

Половые гормоны – эстроген и тестостерон – регулируют репродуктивные функции.

Гормоны выделяются эндокринными железами и свободно циркулируют в крови, ожидая, когда их определят так называемые клетки-мишени.

У каждой такой клетки есть рецептор, который активируется только определенным типом гормонов, как замок – ключом. После получения такого «ключа» в клетке запускается определенный процесс: например, активация генов или производство энергии

Стероиды производятся надпочечниками и половыми железами из холестерина. Типичный гормон надпочечников – гормон стресса кортизол, который активизирует все системы организма в ответ на потенциальную угрозу.

Другие стероиды определяют физическое развитие организма от половой зрелости до старости, а также циклы размножения.

Производные жирных кислот, данные соединения, отличающиеся нестабильностью и оказывающие местное воздействие на находящиеся поблизости от места их выработки клетки, называются также эйкозаноидами. К ним относятся простагландины, тромбоксаны и лейкотриены.

Класс гормонов, производные аминокислоты составлен преимущественно из производных тирозина: адреналин и норадреналин, тироксин и т. д. Первые два синтезируются надпочечниками, третий – щитовидной железой.

Белковые и пептидные гормоны. Пептидные гормоны регулируют в основном обмен веществ. Они состоят из длинных цепочек аминокислот и для их секреции организму нужно поступление белка.

Скорость, с которой в организме протекают процессы обмена веществ, регулируется в том числе и гормонами. Типичный пример пептидных гормонов – гормон роста, который помогает организму сжигать жир и наращивать мышечную массу.

Другой пептидный гормон – инсулин – запускает процесс преобразования сахара в энергию.

К числу белково-пептидных относятся гормоны поджелудочной железы (глюкагон, инсулин), а также гипоталамуса и гипофиза (гормон роста, кортикотропин и др.). В их состав может входить самое разнообразное количество аминокислотных остатков – от 3 до 250 и более.

Продуценты гормонов и практическое использование в различных направлениях биотехнологии. Система желез внутренней секреции работает вместе с нервной системой, образуя нейроэндокринную систему. Это означает, что химические сообщения могут быть переданы в соответствующие части организма либо с помощью нервных импульсов, либо через кровоток при помощи гормонов, либо обоими способами сразу. Гормоны – это своеобразные «ключи», которые запускают определенные

процессы в «клетках-замках». Эти вещества производятся в железах внутренней секреции и регулируют практически все процессы в организме – от сжигания жира до размножения

В организме он продуцируется клетками передней доли гипофиза. Вес этой доли – меньше одной десятой грамма, и лишь небольшая часть ее клеток занята выработкой гормона роста. Его нехватка в организме снижает темп роста, вызывает карликовость (карликовые мыши весят примерно в 2 раза меньше нормальных). Введением гормона можно нормализовать рост.

В медицине при лечении одного пациента требуется 7 мг в неделю очищенного гормона, который ранее получали из гипофиза человека (трупного материала). Наряду с этим уже налажено микробиологическое производство генно-инженерного гормона, позволяющее получать 100 мг препарата из 1 л культуральной среды. В принципе этим способом можно производить килограммы гормона, причем независимо от природы гормона и клеток, где он производится в норме. Генно-инженерное микробиологическое производство выравнивает (унифицирует) условия наработки всех продуктов, т. е. делает биотехнологию индустриальной. Способы получения в сильной мере зависят от особенностей ткани и концентрации в ней гормона, требуют иногда переработки огромных масс дорогостоящих тканей. К примеру, для получения 25-30 мкг гормона секретина необходимо 1 т кишечника коров.

Список производимых гормонов непрерывно пополняется, и их очередность определяется как практической важностью, так и готовностью науки. Создать необходимые продуценты. К гормонам, производство которых начато или начинается, относятся эритропоэтин (регулятор образования эритроцитов и, следовательно, гемоглобина), энкефалины и эндорфины (гормоны нервной системы, которые применяют для снятия болевых ощущений, улучшения памяти, тонуса, настроения).

Микробные клетки пригодны и для производства некоторых стероидных гормонов. Например, *Artbrobacter globiformis* используют для синтеза преднизолона из гидрокортизона, Микробиологическая трансформация позволяет резко сократить число этапов химического синтеза гормона надпочечников – кортизона.

Гормоны применяются в ветеринарии и животноводстве для стимуляции развития и роста животных, улучшения многоплодия, усвояемости кормов, ускорения полового созревания, регламентации сроков беременности и т.д. Ряд гормональных препаратов располагает ярко выраженной анаболической активностью, употребляются в связи с этим для откорма птицы и скота: полипептидные и белковые гормоны, такие как соматотропин, инсулин и др.; производные аминокислот – стероидные, тиреоидные гормоны, их аналоги и производные.

Естественным последствием употребления гормонов в животноводстве возникла проблема загрязнения ими продовольственного сырья и пищевых продуктов.

С развитием науки были изобретены многие гормоны, которые по своему анаболическому действию результативнее природных гормонов в 100 и более раз. Данный факт, а также дешевизна их синтеза обусловили интенсивное введение этих препаратов в практику животноводства. Это, к примеру, синэстрол, диенэстрол, диэтилстрильбэстрол, гекс-эстрол и другие. При всем том, многие синтетические гормоны, в отличие от природных аналогов оказались более устойчивыми, плохо метаболизируются и скапливаются в организме животных в значительных количествах, мигрируя по пищевой цепи в продукты питания людей.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение и опишите биологическую роль гормонов.
2. Расскажите классификацию гормонов.
3. Опишите химический состав и пространственную структуру некоторых гормонов.
4. Назовите продуцентов гормонов среди тканей, органов, организмов.
5. Где используются гормоны в медицине, животноводстве, растениеводстве и биотехнологии?

Лабораторная работа №15
ВЕЩЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК
ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ (НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ)

Цель занятия: Ознакомление с понятием, определением и классификацией нуклеиновых кислот, с химическим составом и пространственной структурой нуклеиновых кислот. Ознакомление с практическим использованием нуклеиновых кислот, в различных научно-инженерных работах. Изучить нуклеиновые кислоты как целевой продукт.

Понятие, определение и классификация нуклеиновых кислот, химический состав и пространственная структура нуклеиновых кислот. Нуклеиновая кислота – высокомолекулярное органическое соединение, биополимер (полинуклеотид), образованный остатками нуклеотидов. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации.

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, макромолекулы которых состоят из многократно повторяющихся звеньев – нуклеотидов. Поэтому их называют также полинуклеотидами. Важнейшей характеристикой нуклеиновых кислот является их нуклеотидный состав. В состав нуклеотида – структурного звена нуклеиновых кислот – входят три составные части:

1. азотистое основание – пиримидиновое или пуриновое. В нуклеиновых кислотах содержатся основания 4-х разных видов: два из них относятся к классу пуринов и два – к классу пиримидинов. Азот, содержащийся в кольцах, придает молекулам основные свойства.

2. моносахарид – рибоза или 2-дезоксирибоза. Сахар, входящий в состав нуклеотида, содержит пять углеродных атомов, т.е. представляет собой пентозу. В зависимости от вида пентозы, присутствующей в нуклеотиде, различают два вида нуклеиновых кислот – рибонуклеиновые кислоты (РНК), которые содержат рибозу, и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), содержащие дезоксирибозу.

3. остаток фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты являются кислотами потому, что в их молекулах содержится фосфорная кислота.

Нуклеотид – фосфорный эфир нуклеозида. В состав нуклеозида входят два компонента: моносахарид (рибоза или дезоксирибоза) и азотистое основание.

Значение нуклеиновых кислот очень велико. Особенности их химического строения обеспечивают возможность хранения, переноса в цитоплазму и передачи по наследству дочерним клеткам информации о структуре белковых молекул, которые синтезируются в каждой клетке. Белки обуславливают большинство свойств и признаков клеток. Понятно поэтому, что стабильность структуры нуклеиновых кислот – важнейшее условие нормальной жизнедеятельности клеток и организма в целом. Любые

изменения строения нуклеиновых кислот влекут за собой изменения структуры клеток или активности физиологических процессов в них, влияя таким образом на жизнеспособность.

Существует два типа нуклеиновых кислот: ДНК и РНК. РНК (рибонуклеиновая кислота), так же как ДНК, представляет собой полимер, мономерами которого служат нуклеотиды. Азотистые основания те же самые, что входят в состав ДНК (аденин, гуанин, цетозин); четвертое – урацил – присутствует в молекуле РНК вместо тимина. Нуклеотиды РНК содержат вместо дезоксирибозы другую пентозу – рибозу.

Химически РНК очень похожа на ДНК. Оба вещества – это линейные полимеры нуклеотидов. Каждый мономер – нуклеотид – представляет собой фосфорилированный N-гликозид, построенный из остатка пятиуглеродного сахара – пентозы, несущего фосфатную группу на гидроксильной группе пятого углеродного атома (сложноэфирная связь) и азотистое основание при первом углеродном атоме (N-гликозидная связь). Главное химическое различие между ДНК и РНК состоит в том, что сахарный остаток мономера РНК – это рибоза, а мономера ДНК – дезоксирибоза, являющаяся производным рибозы, в котором отсутствует гидроксильная группа при втором углеродном атоме.

Азотистых оснований в РНК четыре вида: два пуриновых – аденин (А) и гуанин (G) – и два пиримидиновых – цитозин (C) и урацил (U). Мономеры – рибонуклеотиды РНК – образуют полимерную цепь посредством формирования фосфодиэфирных мостиков между сахарными остатками (между пятым и третьим атомами углерода пентозы). Таким образом, полимерная цепь РНК может быть представлена как линейный сахаро-фосфатный остов с азотистыми основаниями в качестве боковых групп.

Сворачивание полимерной цепи тРНК, состоящей из 76 нуклеотидных мономеров, приводит к формированию очень компактного глобулярного ядра, из которого под прямым углом торчат два выступа. Они представляют собой короткие двойные спирали по типу ДНК, но организованные за счет взаимодействия участков одной и той же цепи РНК. Один из выступов является акцептором аминокислоты и участвует в синтезе полипептидной цепи белка на рибосоме, а другой предназначен для комплементарного взаимодействия с кодирующим триплетом (кодоном) м-РНК в той же рибосоме. Только такая структура способна специфически взаимодействовать с белком-ферментом, навешивающим аминокислоту на т-РНК, и с рибосомой в процессе трансляции, то есть специфически «узнаваться» ими.

Рибосома состоит из двух неравных частей – большой и малой рибосомных субчастиц (субъединиц). Каждая субчастица построена из одной высокополимерной РНК и целого ряда разнообразных рибосомных белков.

Существует три вида основных вида РНК. Информационная (матричная) РНК – мРНК. мРНК представляет собой полинуклеотидную незамкнутую цепь. Единой пространственной структуры, характерной хотя бы для

большинства мРНК, не обнаружено. Все мРНК объединяет их функции – они служат в качестве матриц для синтеза белков, передавая информацию об их структуре с молекул ДНК.

Транспортная (акцепторная) РНК – тРНК. Функция тРНК – перенос аминокислот к синтезируемой молекуле белка. Все виды тРНК имеют сходную пространственную организацию. Благодаря внутрицепочечным комплементарным взаимодействиям молекула тРНК приобретает характерную вторичную структуру, которую традиционно изображают в виде плоского креста, называя ее клеверным крестом. Трехмерная же модель тРНК выглядит несколько иначе. В тРНК выделяют 4 петли (или плеча): акцепторная (служит местом присоединения переносимой аминокислоты); антикодонавая (узнает кодон в мРНК в процессе трансляции); 2 боковые.

Одноцепочечные нуклеиновые кислоты, которые в комплексе с рибосомными белками образуют рибосомы – органеллы, на которых происходит синтез белка. В клетке больше всего содержится рРНК, значительно меньше тРНК и совсем немного мРНК. Между ДНК и РНК есть три основных отличия:

1. ДНК содержит сахар дезоксирибозу, РНК – рибозу, у которой есть дополнительная, по сравнению с дезоксирибозой, гидроксильная группа. Эта группа увеличивает вероятность гидролиза молекулы, то есть уменьшает стабильность молекулы РНК;

2. Нуклеотид, комплементарный аденину, в РНК не тимин, как в ДНК, а урацил – неметилированная форма тимина;

3. ДНК существует в форме двойной спирали, состоящей из двух отдельных молекул. Молекулы РНК, в среднем, гораздо короче и преимущественно одноцепочечные.

Генетическая информация о структуре специфических белков, закодированная в ДНК, переносится из ядра в цитоплазму с помощью молекул РНК. В цитоплазме осуществляется биосинтез белка на рибосомах. Образующиеся белки определяют признаки клетки, а вместе с тем целого организма. Так происходит экспрессия (проявление) генетической информации.

Непосредственное участие в биосинтезе белка принимают молекулы РНК трех видов: транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК) и матричная, или информационная РНК (мРНК). Количество РНК в каждой клетке находится в прямой зависимости от количества вырабатываемого белка. Все виды РНК синтезируются непосредственно на ДНК, которая служит матрицей

Важная роль в процессе использования наследственной информации клеткой принадлежит тРНК. Доставляя необходимые аминокислоты к месту сборки пептидных цепей, тРНК выполняет функцию посредника. Каждой аминокислоте соответствуют две или большее число специфических тРНК.

В результате комплементарного соединения оснований, которые находятся в разных участках полинуклеотидной цепи тРНК, она приобретает

структуру, напоминающую по форме лист клевера. В ней выделяют четыре главные части, выполняющие различные функции. Центральная антикодоновая ветвь содержит антикодон – специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен соответствующему кодону мРНК и может образовывать с ним водородные связи.

Рибосомная РНК (рРНК) составляет более 80% всей РНК клетки. Она кодируется особыми генами, находящимися в нескольких хромосомах и расположенными в зоне ядрышка, называемой ядрышковым организатором.

Каждая рибосома состоит из двух субчастиц – большой и малой. В эукариотической рибосоме малая субчастица 40S состоит из одной молекулы рРНК и 33-х молекул разных белков, большая – из трех разных молекул рРНК и около 40 белков. Прокариотические рибосомы и рибосомы митохондрий и пластид содержат меньше компонентов и имеют меньшие размеры. Молекулы рРНК выполняют, прежде всего, роль каркасов, на которых в строго определенном порядке крепятся рибосомные белки. Кроме того, рРНК обеспечивает связывание рибосомы с определенной нуклеотидной последовательностью мРНК, благодаря чему устанавливается начало считывания информации при образовании полипептидной цепи. 28S рРНК имеет каталитическую активность, то есть является рибозимом.

Специальные участки (или функциональные центры) рибосомы обеспечивают ее взаимодействие с тРНК. В первом – аминокислотном (А – центре) размещается тРНК, несущая аминокислотный остаток (аминоацил-тРНК). В Р-центре (пептидилном) располагается тРНК, нагруженная цепочкой аминокислот, то есть растущим полипептидом. Участки образуются благодаря взаимодействию обеих субчастиц рибосом. В каждый момент биосинтеза белка в центрах рибосомы помещаются два кодона мРНК, которые взаимодействуют с двумя соответствующими им тРНК. Рибосомные субчастицы имеют замысловатую форму, обеспечивающую выполнение ими их функций. Они "пригнаны" друг к другу, но между ними остается щель. Через щель проходит "прочитанная" молекула мРНК, отсюда же выдвигается новосинтезированная полипептидная цепь.

Существует четкое «разделение труда» между субчастицами рибосомы: малая субчастица отвечает за прием и декодирование генетической информации, то есть выполняет генетические функции, в то время как большая обеспечивает ферментативные реакции в процессе трансляции. Предполагают, что образование пептидной связи (реакция транспептидации) катализируется пептидилтрансферазным центром рибосомы, и основной вклад вносит рРНК.

Матричная (мРНК) или информационная (иРНК) составляет всего 3-5% всей содержащейся в клетке РНК. Она переносит генетическую информацию от ДНК к рибосомам, где служит матрицей для биосинтеза полипептидных цепей. В любой данный момент в клетке присутствует чрезвычайно сложная смесь сотен мРНК, каждая из которых кодирует одну или несколько

полипептидных цепей. Большинство мРНК существует в клетке в течение короткого времени, так как распадаются, выполнив свою функцию.

Матричные РНК – это одноцепочечные молекулы самой разной длины. Минимальная длина определяется размером полипептидной цепи, которую она кодирует. Например, для синтеза белка, состоящего из 100 аминокислотных остатков, требуется мРНК из 300 нуклеотидов, поскольку каждая аминокислота кодируется тройкой нуклеотидов (триплетом). Однако мРНК всегда несколько длиннее, так как содержит ряд дополнительных участков. Так, на 5'-конце имеется некодирующий «лидер» длиной от 25 до 150 оснований. мРНК прокариот обычно кодируют два или большее число полипептидов (их называют полигенными). Такие мРНК содержат межгенные области, или спейсеры, которые разделяют отдельные кодирующие участки и, видимо, помогают регулировать скорость транскрипции.

Эукариотические мРНК обычно являются моногенными. Другое отличие эукариотических мРНК – это наличие в них 5'-концевого «кэпа», представляющего собой остаток 7-метилгуанозина, присоединенного посредством трифосфатной связи.

Нуклеиновые кислоты как целевой продукт и их практическое использование. Интерес к нуклеиновой кислоте, как лекарственному средству, по протяженности укладывается в столетний период. Публикации об особой способности нуклеиновой кислоты повышать общую сопротивляемость организма стали появляться в 1892 году. Горбачевский в 1883 г., и Морек в 1894 г., использовали нуклеиновую кислоту для лечения волчанки. А. Косеель сообщил, что нуклеиновая кислота обладает выраженным бактерицидным действием, поэтому играет основную роль в борьбе с заразным началом.

Г. Воген в 1894 г., Е. Вард в 1910 г., Б и Ф.Г.Буткевич в 1912 г., успешно лечили легочный и костный туберкулез, впрыскивая под кожу нуклеиновокислый натрий. Исаев в 1894 г., Милке в 1904., Лейн в 1909 г., Писарев в 1910 г., Абелуа и Бадье в 1910 г., расценивали нуклеиновую кислоту как специфически действующее вещество в процессе сопротивляемости организма против таких вредных бактерий, как холерный вибрион, кишечная и бугорчатая палочки, стафилококк, стрептококк, диплококк, сибирская язва, а также против дифтерии и столбнячного токсинов. С. Штерн заменил ртутное лечение сифилиса лечением нуклеиновой кислотой и достиг у больных полного исчезновения всех проявлений сифилиса.

Было показано, что проникновение поступающей извне ДНК в различные виды клеток различно. Полимерная ДНК поглощается клеткой намного больше, чем гидролизованная (расщепленная на мелкие фрагменты), причем длительное время ДНК остается в первоначальной форме, не разрушаясь. Данные большинства исследователей 70-х годов прошлого столетия убеждают, что введенные внутрь организма нуклеиновые кислоты могут быть доставлены к клетке без разрушения. РЛ.Либензон и

Г.Г.Русинова показали, что активно размножающиеся ткани (костный мозг, эпителий тонкого кишечника, селезенка) интенсивно поглощают извне ДНК. Клетки и ткани органов, попадающие в чрезвычайные стрессовые условия, захватывают ДНК чрезвычайно активно. При этом, терапевтическая эффективность экзогенной ДНК связана с сохранением ее полимерной структуры. Мелкие фрагменты – олигоили мононуклеотиды гораздо менее эффективны.

Работами зарубежных ученых было показано, что ДНК – натриевая соль с молекулярной массой 500 кД не несет генетической информации, но обладает терапевтической активностью. Наиболее высокая терапевтическая активность нативной натриевой соли ДНК была установлена в интервале молекулярной массы 200-500 килодалтон.

Несмотря на бурное развитие кардиохирургической помощи, патологические состояния, сопровождающиеся ишемией миокарда, зачастую требуют агрессивной медикаментозной коррекции. Апоптоз (греч. *apo* - отделение + *ptosis* - падение), «программированная смерть клеток», или «клеточный суицид» является важнейшим неспецифическим фактором развития многих заболеваний, а также процесса физиологического старения. При инфаркте миокарда нарушение кровоснабжения прилежащих к зоне некроза тканей запускает процесс программируемой гибели клеток сердца (апоптоз). Массовая гибель клеток сердечной мышцы в условиях ишемии приводит к снижению насосной функции сердца.

Высокая, но все еще недостаточная эффективность существующих схем лечения влечет за собой необходимость поиска альтернативных технологий, способных восстанавливать функцию миокарда, таких, например, как использование стволовых клеток. Перспективным представляется также разработка препаратов блокирующих процессы программируемой гибели клеток сердечной мышцы. Высокий метаболизм клеток сердца делает их чрезвычайно уязвимыми при ишемии, в условиях дефицита энергетических и пластических субстратов. В моделях на животных было показано, что ишемия приводит к уменьшению содержания в сердечной мышце нуклеиновых кислот. Аналогичный дисбаланс нуклеотидов при ишемии отмечается в субэндокардиальных слоях человеческого сердца. Исследователи обнаружили, что содержание нуклеиновых кислот в глубоких слоях миокарда было снижено на 20%. Они предположили, что восстановление баланса нуклеотидов с использованием препаратов ДНК и нуклеиновых кислот может оказать защитное влияние на клетки сердца и препятствовать развитию апоптоза.

В опытах было показано значительное улучшение сократительной способности сердечной мышцы животных в условиях после внутривенного введения «коктейля» из нуклеиновых кислот. В экспериментах на животных препараты на основе натриевой соли ДНК показали эффективность при аритмиях, возникающих при восстановлении кровотока после ишемии.

Проведенные клинические испытания с препаратами на основе натриевой соли ДНК показали, что препараты способны улучшать клиническое состояние, уменьшать частоту, продолжительность и интенсивность приступов стенокардии, улучшать сократительную способность сердца, увеличивать переносимость физических нагрузок у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца.

Старение вызывается вырождением клеток. Наш организм построен из миллионов клеток, каждая из которых живет около двух лет или меньше. Но, прежде чем погибнуть, клетка воспроизводит себя. При каждом успешном воспроизводстве клетка претерпевает определенное изменение, в сущности, вырождение. Так что, по мере того, как наши клетки меняются или вырождаются, мы стареем.

Вырождающиеся клетки можно омолодить, снабдив их веществами, такими как нуклеиновые кислоты, которые напрямую питают их. Наши нуклеиновые кислоты – это ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота). ДНК – это, по сути, универсальный химический реактор для новых клеток. Он рассылает молекулы РНК, словно команду хорошо обученных рабочих, на формирование клеток. Когда ДНК прекращает давать команды РНК, прекращается построение новых клеток и сама жизнь.

Продукты, богатые нуклеиновыми кислотами: завязь пшеницы, отруби, шпинат, спаржа, грибы, рыба (особенно сардины, лосось, анчоусы), печень цыпленка, овсянка и лук.

Действие нуклеиновых кислот на репарацию тканей, в частности печени после частичной ее резекции, хорошо изучено. Известно также, что нуклеотиды оказывают многостороннее защитное действие на слизистую кишечника и способствуют ее восстановлению. В экспериментах у крыс, получавших пищевые добавки, содержащие нуклеотиды, было обнаружено значительно большее содержание белка и ДНК в слизистой кишечника, увеличение активности ферментов, большая высота ворсинок и большая скорость размножения эпителия кишечника. Введение нуклеотидов мышам приводило к уменьшению заселения кишечника патогенными бактериями и быстрому восстановлению поврежденной стенки кишечника. Интересен и такой факт – при добавлении фрагментов ДНК/РНК к молочным смесям частота диареи у детей достоверно уменьшалась. При ОРЗ и энтеровирусной инфекции удаление вируса со слизистых происходит в 2-3 раза быстрее, если к питательным смесям добавлены нуклеотиды. Причина этого защитного действия не ясна, обычно связывается с усилением размножения и созревания клеток кишечника, а также улучшением работы лимфоидной ткани кишечника.

Основная проблема в обмене нуклеотидов состоит в том, что нуклеиновые кислоты на 95-98% разрушаются в тонком кишечнике до пуриновых и пиримидиновых оснований. Однако некоторые клетки – клетки тонкого кишечника, лимфоидная ткань, печеночные клетки и мышечные

клетки способные усваивать фрагменты РНК/ДНК и встраивать их в собственные нуклеиновые кислот. Важно, что при стрессе, травме, усиленном росте кишечный барьер становится более «прозрачным» для фрагментов ДНК/РНК, и процент усвоения фрагментов нуклеиновых кислот может вырасти на порядок.

Область применения нуклеотидов в гастроэнтерологии охватывает широкий спектр заболеваний, которые объединены общими патогенетическими звеньями: воспаление, когда имеется дефицит потребления клеток иммунной системы; дефекты эпителия, когда требуется репарация поврежденных тканей; гормональный дисбаланс и интоксикационный синдром вследствие различных поражений печени, когда требуется пластический материал для восстановления клеток печени и их синтетической функции.

Очень активно фрагменты ДНК улучшают функцию печени, что проявляется в первую очередь повышением уровня защиты против повреждающего действия алкоголя и других бытовых интоксикаций. При назначении фрагментов нуклеиновых кислоту больных острым и хроническим гепатитом в течение нескольких дней происходит нормализация уровня биохимических показателей печени – снижается общий билирубин, также происходит снижение уровня общего фибриногена, ведущего показателя активности воспалительного процесса. Все это позволяет использовать препараты на основе фрагментированной ДНК при различных заболеваниях гастроэнтерологического профиля с хорошими результатами.

Еще более впечатляюще выглядят результаты использования нуклеотидов у тяжелых больных – частота вторичных гнойных осложнений (пневмония, панкреатит, сепсис) снижается в 3 и более раз при добавлении к питательным смесям нуклеотидов и пробиотиков (бифидобактерий и/или лактобактерий). В настоящее время однозначно доказано, что именно повышение проницаемости кишечного барьера является причиной развития критических состояний. Повреждение слизистой оболочки кишки, снижение активности макрофагов и лимфоцитов в стенке кишки приводит к проникновению бактерий и токсинов в кровь и вызывает поражение жизненно важных органов. Отсутствие адекватного питания у тяжелых больных сопровождается высокой смертностью и увеличивает продолжительность госпитализации.

В настоящее время питание для больных, находящихся в критическом состоянии, должно включать пробиотики (бифидо- и лактобактерии), волокна, омега-жирные кислоты и нуклеотиды.

Таким образом, к настоящему времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих об эффективности использования фрагментированной ДНК в качестве диетического компонента при самой разнообразной патологии. Имеются доказательства пользы от использования фрагментированной ДНК в качестве стимулятора гемопоэза и

иммуномодулятора у пациентов с лучевой болезнью, а также у ослабленных больных. Использование фрагментированной ДНК способствует восстановлению барьерной и иммунной функции кишечника у пациентов, находящихся в критическом состоянии, что позволяет значительно снизить смертность у крайне тяжелых пациентов. Перспективным направлением является использование фрагментированной ДНК в гастроэнтерологии и кардиологии, что диктует необходимость проведения более крупных исследований в этих областях.

Контрольные вопросы:

1. Дайте понятие и определение нуклеиновым кислотам.
2. Опишите принципы классификации нуклеиновых кислот.
3. Перечислите особенности строения ДНК и РНК.
4. Где практически используются нуклеиновые кислоты?

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. – М.: Издательский центр «Академия», 2012. – С.25-64.
- 2 Клунова С.М., Егорова Т.А., Живухина Е.А. Биотехнология – М., 2010. С.40-70.
- 3 Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. – Алматы: Конжик, 1996. – С. 19-21.
- 4 Загоскина Н. В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. – М., 2009. – С. 34-39.
- 5 Кухар Е.В., Мальчевская Е.А., Абильдина Д.А. Методические указания по выполнению лабораторно-практических работ по дисциплине «Объекты биотехнологии». – Астана, 2018. – С.42-57.
- 6 Тривен М.Д. Имобилизованные ферменты (биотехнология): Пер. с англ. – М., 1983. – С. 11-14.
- 7 Альмагамбетов К.Х. Основы биотехнологии. – Астана, 2006. – С. 5- 14.
- 8 Фрешни Р.Я Культура животных клеток. Методы. – М., 1989. – С. 56.
- 9 Спир Р.Е. Биотехнология клеток животных / Р.Е. Спир, Дж. Гриффитс. – Т.2. – М.: Агропромиздат, 1989. – 507 с.
- 10 Першина Л.А. Основные методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений. Учебное пособие. Издание второе, переработанное и дополненное. – Новосибирск: Новосиб. Гос. ун-т, 2005. – 139 с.
- 11 <http://wikipedia.org.ru>
- 12 <http://soil.msu.ru>
- 13 <http://www.krugosvet.ru>
- 14 <http://www.biotechnolog.ru>