

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторным занятиям занятиям по курсу
«Основы биотехнологии»

Для студентов специальностей:

Н.04.01.00 – биология;

Н.06.01.08 – экология

МИНСК 2009

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	5
1.1. ПРОДУКЦИЯ ЭКЗОФЕРМЕНТОВ ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ <i>ERWINIA</i>	5
2 МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ....	16
2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПЛАЗМИДЫ pHP _{r7} И ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ <i>ESCHERICHIA COLI</i> LBG 1605.....	16
2.2. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ КАРОТИНОГЕНЕЗА <i>PANTOEA</i> <i>AGGLOMERANS</i> В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ β-КАРОТИНА.....	24
3. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК В БИОТЕХНОЛОГИИ.....	30
3.1. ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК <i>PSEUDOMONAS</i> <i>FLUORESCENS</i> В ГЕЛЕ АЛЬГИНАТА КАЛЬЦИЯ.....	30
4. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ.....	33
4.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ХЛЕБОПЕЧЕНИИ.....	33
4.2. МИКРООРГАНИЗМЫ И ПРОИЗВОДСТВО МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ.....	35
УЧЕБНАЯ ПРОГРАММА КУРСА «ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ».....	40
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ КСР ПО КУРСУ «ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ».....	43
ЛИТЕРАТУРА.....	49

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:

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

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

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

- 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;

- 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.

1. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

1.1. ПРОДУКЦИЯ ЭКЗОФЕРМЕНТОВ ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ *ERWINIA*

Из многих тысяч изученных и охарактеризованных ферментов на долю 20 приходится более 90 % ферментов, которые используются в настоящее время в промышленности. В табл. 1 перечислены наиболее важные из них и указана область их применения.

Таблица 1

Наиболее важные ферменты и области их применения

Фермент	Применение
α -Амилаза	Пивоварение, производство спирта
Аминоацилаза	Получение L-аминокислот
Бромелаин	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Целлюлаза	Получение спирта и глюкозы
Фицин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоамилаза	Пивоварение, производство спирта
Глюкозоизомераза	Производство сиропов с высоким содержанием фруктозы
Глюкозооксидаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Инвертаза	Инверсия сахарозы
Лактаза	Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы
Липаза	Сыроварение, получение ароматизаторов
Папанн	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеаза	Детергент, производство спирта
Реннет	Сыроварение

Многие из промышленно важных ферментов относятся к классу деполимераз и являются внеклеточными, действуя на полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Преимущества внеклеточных ферментов для их промышленного получения заключаются в следующем:

- доступность обнаружения штаммов-продуцентов за счет диффузии ферментов в агаризованную среду, содержащую субстрат для них и появлению вокруг колоний зон, свидетельствующих о действии фермента;

- возможность повышения количественного выхода ферментов:
 - а) за счет правильного выбора штаммов-продуцентов;
 - б) мутагенеза клеток продуцента;
 - в) селекции продуцента на сверхсинтез ферментов;
 - г) клонирования генов, ответственных за продукцию ферментов;
 - д) регуляции синтеза продукции ферментов факторами внешней среды;
- возможность создания условий культивирования, обеспечивающих максимальную продукцию фермента;
- относительная простота и легкость очистки ферментных препаратов.

Внеклеточные ферменты, продуцируемые фитопатогенными бактериями рода *Erwinia*, относятся в основном к классам протеаз, целлюлаз и пектиназ (в частности, пектатлиаз).

Протеолитические ферменты повсеместно встречаются у микроорганизмов, а внеклеточные протеазы, вероятно, наиболее широко распространены из всех микробных синтезируемых ферментов. Эти ферменты легко обнаружить и они часто синтезируются с высоким выходом. Микробные протеазы можно сгруппировать в три класса: сериновые, металло- и кислые протеазы, которые имеют оптимумы активности соответственно при щелочной, нейтральной или кислой реакции среды.

Характерное свойство сериновых протеаз – наличие остатка серина в активном центре молекулы. Сериновые протеазы представляют собой эндопептидазы с высокой протеолитической активностью, сочетающейся с низкой специфичностью. Эти протеазы используются в моющих средствах и имеют несомненную ценность для очистки одежды, загрязненной кровью, пищей или какими-нибудь другими содержащими белок веществами. В кожевенной промышленности протеазы используют в двух процессах: для удаления волос со шкур и для умягчения, т. е. придания коже мягкости.

В типичном случае металлопротеазы содержат атом необходимого металла, обычно цинка, и обнаруживают оптимальную активность при нейтральной реакции среды. Они являются ферментами эндо-типа и действия и преимущественно расщепляют пептиды с гидрофобными боковыми цепями. Металлопротеазы используются для умягчения кож и, кроме того, находят применение в пивоваренной и спиртовой промышленности. Они могут быть использованы для предотвращения образования мути – белкового осадка, выпадающего при хранении пива на холоде. Для этой цели используются также растительные ферменты: папаин и бромелин.

Кислые протеазы с низким оптимумом рН редко встречаются у бактерий, но преобладают у грибов. Они обнаруживают значительное сходство с пищеварительными ферментами животных: пепсином и химозином. Поэтому данные ферменты используют как заменители животных протеаз, а главная область их применения – производство сыра и соевого соуса. Кислые протеазы рассматриваются как заменители телячьего сычуга. Сычуг (экстракт желудков телят) содержит химозин, у которого коагулазная активность преобладает над протеолитической, что используется для сворачивания белков молока в производстве сыра. Но по мере старения животного химозин заменяется пепсином. Применение микробных сычугов более выгодно в связи с неограниченностью их источников, дешевизной производства и стабильностью качества. Грибные протеазы нашли также применение в хлебопекарной промышленности. Содержание клейковины в муке, используемой для выпечки хлеба, может широко варьировать, что приводит к необходимости видоизменять процесс приготовления теста, чтобы обеспечить получение стандартного хлеба. Грибные протеазы используют для деградации клейковины до постоянного уровня, что позволяет стандартизировать и сократить операцию хлебопечения.

Целлюлазы – комплекс ферментов, которые выделяют многие грибы и бактерии. Их совместное действие приводит к расщеплению целлюлозы. Целлюлоза является самым распространенным природным полимером. Его длинные цепи состоят из остатков D-глюкозы, соединенных β -1,4-связями. Целлюлоза совместно с лигнином и гемицеллюлозами образует лигноцеллюлозный материал, на долю которого приходится основная часть биомассы, остающейся в огромном количестве в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей хозяйственной деятельности человека. Эти отходы можно перерабатывать и использовать в качестве промышленного сырья. У некоторых микроорганизмов целлюлазы входят в состав целлюлосомы – белкового комплекса, находящегося на клеточной поверхности. В целлюлосому входят следующие ферменты:

- эндоглюконаза, которая гидролизует β -1,4-связи между соседними остатками глюкозы в неплотно упакованных областях целлюлозы, образуя разрывы в середине цепи;
- экзоглюконаза, которая расщепляет разорванные целлюлозные цепи с нередуцирующих концов с образованием глюкозы, целлобиозы (два остатка глюкозы) и целлотриозы (три остатка глюкозы);
- целлобиогидролаза, которая часто присутствует в целлюлолитических грибах и является разновидностью экзоглюконазы, отщепляющей

фрагменты из 10 и большего числа остатков глюкозы с нередуцирующих концов молекул целлюлозы;

- β -глюкозидаза, или целлобиаза, которая катализирует превращение целлобиозы и целлотриозы в глюкозу.

Целлюлоза – очень ценный материал, из которого можно получать множество продуктов (например, глюкозу и этанол). Но сначала необходимо высвободить ее из комплекса с лигнином и гемицеллюлозами. Однако необходимые для этого энергетические затраты существенно повышают стоимость конечного продукта. Тем не менее созданы штаммы *S. cerevisiae* и *Z. mobilis*, эффективно преобразующие в этанол целлюлозу после введения им целлюлазных генов. В настоящее время исследуется возможность использования целлюлаз при промышленной биопереработке бумажных отходов в этанол. В последнее время интерес к целлюлозосодержащим отходам сельского хозяйства появился в связи с возможностью их использования в качестве субстратов для получения белка одноклеточных микроорганизмов (БОО), применяющегося в качестве пищевых добавок или корма для скота. Особо актуально это потому, что ранее для таких целей перспективными считались нефть и нефтепродукты, но в связи с увеличением цен на нефть интерес к подобным проектам пропал.

Пектиназы используются почти исключительно в промышленности, перерабатывающей овощи и фрукты. Пектины – это структурные полисахариды, находящиеся внутри клеточных стенок и в межклеточном пространстве высших растений. Благодаря такой локализации они связывают волокна целлюлозы друг с другом, образуя ригидный матрикс, а также соединяют клетки. Пектины состоят из цепей неполного метилового эфира 1,4- α -галактуроната. В деметилированном виде эту молекулу называют пектиновой кислотой или полигалактуроновой кислотой.

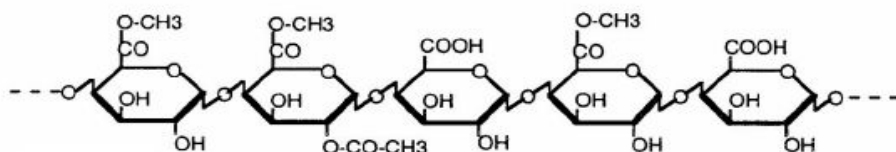


Рис. 1. Строение молекулы пектина

Пектиназа включает несколько разных ферментов, подразделяемых на две главные группы: 1) пектинэстеразы, которые разрушают эфирные

связи с образованием метанола и полигалактурановой кислоты; 2) деполимеразы, которые разрывают гликозидные связи в пектине.

Промышленные препараты пектиназы производят преимущественно из грибов. Традиционное и самое широкое их применение состоит в просветлении яблочного, грушевого и виноградного соков, которым пектин часто придает мутность и вязкость. Такая депектинация необходима для соков, подвергаемых концентрированию. Обработка пектиназой исходной пульпы позволяет увеличить выход и качество сока. Пектиназы используются также для просветления вина и сока citrusовых. Наряду с целлюлазами пектиназы могут применяться в производстве спирта из отходов сельскохозяйственной продукции и деревообрабатывающей промышленности.

Существует ряд качественных и количественных реакций, позволяющих относительно просто определить наличие внеклеточных деполимераз.

Протеазы могут быть обнаружены при включении в состав среды в качестве дополнительного источника углерода и энергии белков молока, желатины и т. п. На агаризованной среде в случае продукции фермента образуются зоны просветления вокруг колоний продуцирующих штаммов.

Выявление целлюлаз при выращивании продуцентов на агаризованных средах основано на расщеплении содержащих целлюлозу субстратов с их последующим окрашиванием и определением размеров зон разложения субстратов.

Пектатлиазы могут быть детектированы спектрофотометрическим методом, основанном на образовании продуктов разрушения молекул пектинов, имеющих пик поглощения в ультрафиолетовой области спектра, или чашечным методом при использовании в качестве субстрата полипектата натрия.

Биосинтез внеклеточных ферментов бактериями рода *Erwinia* подвержен регуляции за счет механизма катаболитной репрессии (КР) глюкозой. Суть этого явления заключается в том, что продукция ферментов, участвующих в катаболизме многих источников углерода, резко снижается при добавлении в среду глюкозы – наиболее предпочтительного источника углерода и энергии.

Для энтеробактерий транспорт глюкозы, как и некоторых других сахаров и их производных (фруктозы, маннозы, маннитола, сорбита, сахарозы, N-ацетилглюкозамина и других), в клетки осуществляется при участии фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферазной системы (ФТС). ФТС представлена комплексом ферментов, которые последовательно

осуществляют перенос фосфогруппы с фосфоенолпирувата (ФЕП) на углеводы, поступающие в клетку. Их принято называть ФТС-углеводами (ФТС-субстратами). Углеводы, транспортируемые в клетку с помощью соответствующих переносчиков и без участия ФТС, называются не-ФТС-углеводами (не-ФТС-субстратами). Для энтеробактерий к их числу относятся лактоза, глицерин, галактоза, мальтоза, ксилоза и др. По принятой в настоящее время модели транспорт сахаров в клетки энтеробактерий, к которым относятся бактерии рода *Erwinia*, осуществляется следующим образом (рис. 2).

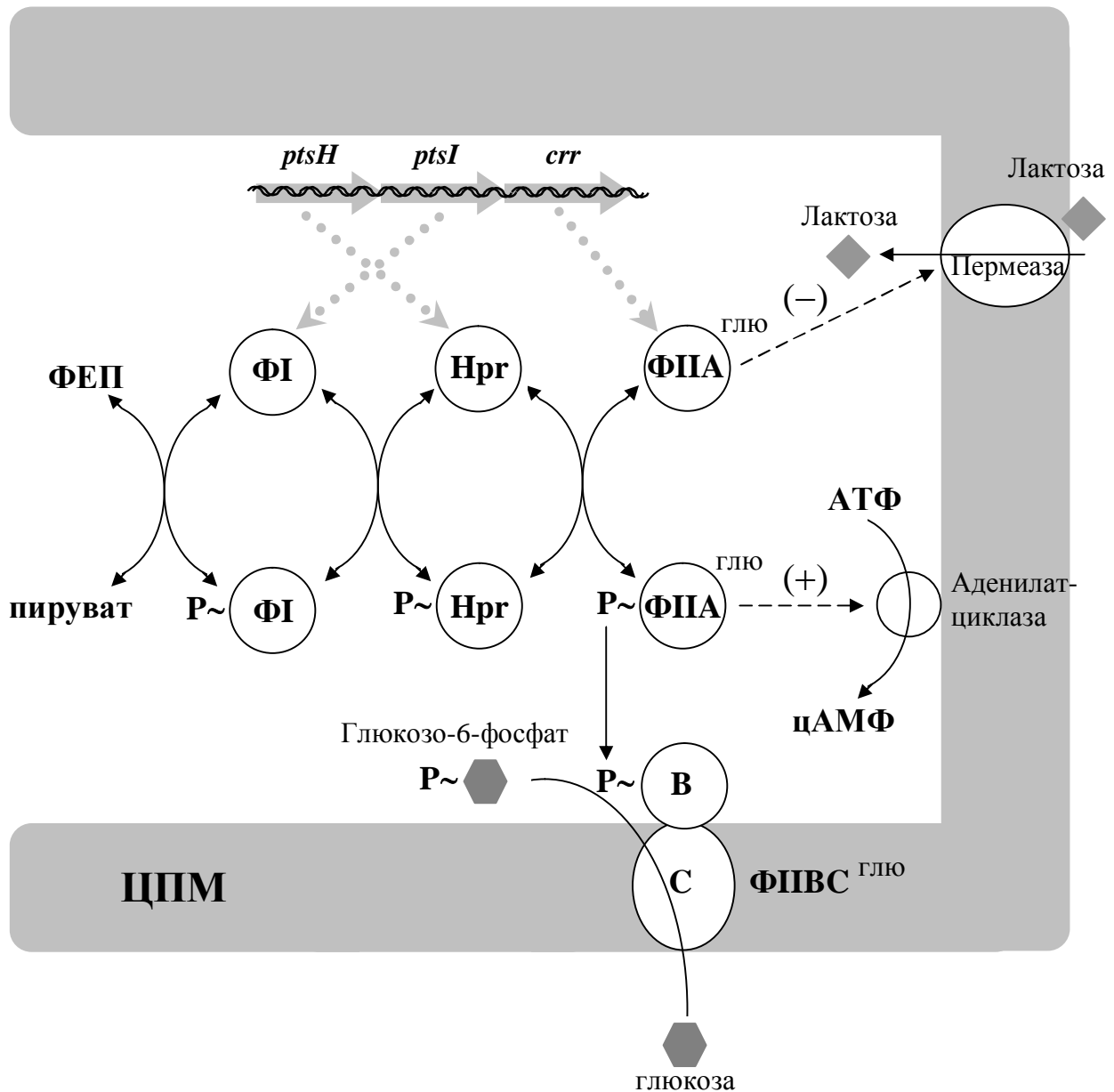


Рис. 2. Схема транспорта ФТС-углеводов и не-ФТС-субстратов в клетки энтеробактерий: знак «+» — активирующее и «-» — ингибирующее действие домена ФІІА^{ГЛЮ}.

Фосфатная группа от ФЕП переходит на компоненты ФТС – сначала на фермент I (ФI), а с него на белок НPr. ФI и НPr-белок – это растворенные в цитоплазме белки, участвующие в фосфорилировании всех ФТС-углеводов, поэтому они называются общими ФТС-белками. Далее белок НPr передает фосфогруппу на субстратспецифичный фермент II (ФII), который является специфической пермеазой. Для различных углеводов существуют соответствующие ФII. Обычно в состав различных ФII входит три домена, но их может быть от одного до четырех. В транспорте глюкозы в клетку участвует ФII^{глю}, состоящий из трех доменов. НPr-белок передает фосфогруппу на растворенный в цитоплазме домен ФIIА^{глю}, с которого фосфатная группа переносится на домен ФIIB^{глю}, тесно связанный с доменом ФIIC^{глю}, локализованный в мембране и формирующий в ней транслокационный канал. По этому каналу глюкоза, фосфорилируясь, поступает в клетку. Только после получения фосфогруппы сахар может проникнуть в клетку. Таким образом, поступающий углевод претерпевает химическую модификацию и способен практически сразу же вступать в реакции гликолиза. Такая реакция по сопряжению фосфорилирования и транспорта сахаров – одно из многих преимуществ ФТС в сравнении с другими транспортными системами.

Оказалось также, что ряд компонентов ФТС помимо «прямых» транспортных функций участвует в регуляторных механизмах, определяющих утилизацию не-ФТС-субстратов, поступающих за счет собственных транспортных систем. Один из таких механизмов определяется уровнем фосфорилирования глюкозоспецифичного ФIIА^{глю}.

В клетках бактерий дикого типа при отсутствии в среде глюкозы, наблюдается меньшее содержание дефосфорилированной формы (ФIIА^{глю}) по сравнению с фосфорилированной формой (ФIIА^{глю} ~ P) этого фермента. При росте на глюкозе в качестве единственного источника углерода и энергии равновесие смещается в сторону увеличения доли формы ФIIА^{глю}, так как ФIIА^{глю} ~ P передает фосфогруппы на глюкозоспецифичные мембрансвязанные ферменты, которые затем фосфорилируют поступающий углевод.

К явлению катаболитной репрессии это имеет следующее отношение. С одной стороны, показано, что дефосфорилированная форма ФIIА^{глю} (наблюдается при активном транспорте глюкозы) способна связываться с пермеазами не-ФТС-углеводов и значительно снижать их функционирование, с другой – фосфорилированная форма ФIIА^{глю} ~ P (наблюдается при отсутствии глюкозы) активирует аденилатциклазу, катализирующую образование цАМФ из АТФ. Обнаружено, что аденилатциклаза обладает N-терминальным каталитическим доменом и C-терминальным ингиби-

торным доменом, которые разобщаются между собой формой ФПА^{глю} ~ Р, что ведет к повышению активности аденилатциклазы более чем в 10 раз., В свою очередь, цАМФ необходим для активации БАК (белок-активатор катаболизма). В индуцибельных оперонах, к числу которых относятся и опероны, определяющие синтез внеклеточных ферментов, наличие активированной формы БАК во многих случаях определяет взаимодействие РНК-полимераза с областью промотора, а также стабильность комплекса РНК-полимераза – ДНК. Следовательно, при снижении внутриклеточного содержания или активности аденилатциклазы не происходит образования достаточного количества цАМФ и соответственно активации БАК. Следствием этого является снижение транскрипционной активности индуцибельных оперонов. В результате этого в клетках бактерий дикого типа возникает катаболитная репрессия в присутствии глюкозы, которая действует опосредованно через соотношение форм ФПА^{глю}/ФПА^{глю} ~ Р.

У мутантов с дефектами ФТС-компонентов (*pts*-мутантов) наблюдается общее снижение деятельности индуцибельных оперонов (на 20 – 50 %) за счет существования в клетке только нефосфорилированной формы ФПА^{глю}, однако присутствие в среде глюкозы не приводит к возникновению явления катаболитной репрессии. Таким образом, *pts*-мутанты резистентны к катаболитной репрессии глюкозой в отношении продукции внеклеточных ферментов.

ПЛАН РАБОТЫ

- I. Используя различные штаммы бактерий рода *Erwinia*, выявить качественными методами продукцию внеклеточных ферментов целлюлаз и протеаз.
- II. Определить влияние катаболитной репрессии (КР) глюкозой на продукцию внеклеточных ферментов пектаттиаз у *ptsI*-мутанта и бактерий дикого типа *Erwinia chrysanthemi*.

ХОД РАБОТЫ

ЗАНЯТИЕ 1. Определение продукции ферментов и влияния на нее катаболитной репрессии

I. Для определения протео- и целлюлолитической активности используют следующие штаммы бактерий, выросших на поверхности полноценной агаризованной среды:

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* 3–2 – дикий тип;

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* J289 – дикий тип;
Erwinia chrysanthemi A350 – дикий тип;
Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* D3310 – гиперпродуцент экзоферментов.

1. Определение целлюлолитической активности (чашка «Cel») проводят на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей 0,2 % растворимой целлюлозы. Исследуемые штаммы засевают с помощью петли «медальонами» и чашки инкубируют в течение 48 ч при 28 °С. После указанного периода, чашки заливают 0,1 % раствором красителя Конго красного (3–4 мл) и выдерживают 15 мин. Краситель сливают, а чашки промывают несколько раз 8 % раствором NaCl. Наличие светлых неокрашенных пятен в месте роста бактерий и вокруг них свидетельствует о продукции клетками внеклеточных целлюлолитических ферментов.

2. Определение протеолитической активности (чашка «Prt») проводят на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей в качестве субстрата 1 % обезжиренного молока. Исследуемые штаммы засевают с помощью петли «медальонами» и чашки инкубируют в течение 48 ч при 28 °С. Отмечают наличие зон просветления вокруг нанесенной суспензии микроорганизмов, которые свидетельствует о продукции бактериями протеолитических ферментов.

II. Для определения влияния катаболитной репрессии глюкозой на продукцию пектатлиаз используют следующие штаммы бактерий, выросших на поверхности полноценной агаризованной среды:

Erwinia chrysanthemi ENA49 – дикий тип бактерий, чувствительный к КР;

Erwinia chrysanthemi ENA49/50 – *ptsI*-мутант бактерий, устойчивый к КР;

Erwinia chrysanthemi ENA49/50 ($R'ptsI^+$) – *ptsI*-мутант, несущий в составе плазмиды pULB113 *ptsI*⁺-ген *E. coli*.

3. Пектатлиазная активность (чашка «Pel») определяется на среде, содержащей полипектатный гель. Он готовится следующим образом: 3 мл 1 % раствора полипектата натрия наслаивают на поверхность полноценной агаризованной среды, содержащей ионы Ca²⁺ (3 мл 1М раствора CaCl₂ на 100 мл среды). Исследуемые штаммы засевают с помощью петли «медальонами» и чашки инкубируют в течение 48 ч при 28 °С. Штаммы бактерий, продуцирующие пектолитические ферменты, образуют лунки на поверхности полипектатного геля.

4. Для определения влияния катаболитной репрессии на продукцию внеклеточных пектаттиаз (чашка «Pel+glu») те же штаммы бактерий *Erwinia chrysanthemi* выращивают на среде для определения пектолитической активности с повышенным количеством (1 %) глюкозы.

5. Способность штаммов *Erwinia chrysanthemi* утилизировать глюкозу (чашка «EMB») определяется на среде EMB, в которую входит полноценная агаризованная среда, глюкоза и красители. Исследуемые штаммы засевают с помощью петли «медальонами» на поверхность среды и чашки инкубируют в течение 48 ч при 28 °С. Штаммы бактерий, утилизирующие глюкозу приобретают темно-синий (металлический) цвет, не утилизирующие глюкозу – розовый цвет.

ЗАНЯТИЕ 2. Учет результатов

Для этого чашки просматривают и отмечают:

1. наличие целлюлолитической активности у штаммов бактерий рода *Erwinia* по появлению зон просветления на среде с растворимой целлюлозой после окрашивания Конго красным (чашка «Cel»).

2. наличие протеолитической активности у штаммов бактерий рода *Erwinia* по проявлению зон просветления вокруг штаммов после их выращивания на среде с обезжиренным молоком (чашка «Prt»).

Полученные результаты заносят в табл. 2.

Таблица 2

Активность ферментов у штаммов бактерий рода *Erwinia*

Фермент Штамм	Целлюлазы	Протеазы
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 3-2		
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> J289		
<i>Erwinia chrysanthemi</i> A350		
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> D3310		

Примечание. Степень выраженности ферментативной активности условно определяют в баллах (от «0» до «5»).

II. 3. наличие пектолитической активности у штаммов *Erwinia chrysanthemi* по образованию лунок разжижения полипектатного геля вокруг засеянных колоний (чашка «Pel»).

4. влияние катаболитной репрессии глюкозой на продукцию пектатлиаз у штаммов *Erwinia chrysanthemi* по образованию лунок разжижения полипектатного геля вокруг засеянных колоний (чашка «Pel+glu»).

5. способность утилизировать глюкозу у штаммов *Erwinia chrysanthemi* по окрашиванию колоний (чашка «EMB»).

Полученные результаты заносят в табл. 3.

Таблица 3

Активность пектатлиаз и характер роста у штаммов бактерий *Erwinia chrysanthemi*

Свойство Штамм	Пектолитическая активность на среде		Способность утилизировать глюкозу
	без глюкозы	с глюкозой	
<i>Erwinia chrysanthemi</i> ENA49			
<i>Erwinia chrysanthemi</i> ENA49/50			
<i>Erwinia chrysanthemi</i> ENA49/50 (R' <i>ptsI</i> ⁺)			

Примечание. Степень выраженности пектолитической активности условно определяют в баллах (от «0» до «5»); способность утилизировать глюкозу обозначают знаками «-» и «+».

Вопросы для теоретической подготовки

1. Обоснуйте механизмы регуляции работы индуцибельных и репрессибельных оперонов, негативного и позитивного контроля деятельности оперонов на примере лактозного и триптофанового оперонов *Escherichia coli*.

2. Опишите явление катаболитной репрессии, диауксии, роль белка БАК в транскрипции индуцибельных оперонов.

3. Предложите способы повышения продукции аминокислот или ферментов на уровне оперона.

2. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ПЛАЗМИДЫ pHPr7 И ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* LBG 1605

Для введения в клетки бактерий чужеродной ДНК необходимо наличие так называемого клонирующего вектора, т. е. автономно реплицирующегося в клетках фрагмента ДНК. Большая часть известных векторов сконструирована на основе имеющихся в клетках бактерий внехромосомальных элементов типа плазмид или бактериофагов. При их создании и использовании придерживаются следующих критериев:

- вектор должен быть небольшим в связи с тем, что эффективность трансформации клеток-хозяев снижается по мере увеличения размера плазмиды до 15 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) и выше;
- вектор должен быть хорошо охарактеризован относительно числа генов и их расположения, а также сайтов рестрикции и нуклеотидной последовательности;
- вектор должен легко реплицироваться в клетке-хозяине;
- вектор должен иметь один или несколько селективных маркеров (генов), позволяющих легко отличить клетки, несущие вектор, от нетрансформированных клеток;
- идеальный вектор должен дополнительно содержать маркер, который может быть активирован или инактивирован путем встраивания фрагментов гетерологичной ДНК;
- вектор должен содержать максимальное число уникальных сайтов рестрикции, в которые может быть осуществлена вставка гетерологичной ДНК.

Большая серия векторных плазмид, обозначенных символом pBR, создана на основе репликона природной плазмиды ColEI путем его объединения с генами устойчивости к антибиотикам. Генетическая карта одного широко распространенного вектора этой серии, pBR322, изображена на рис. 3. Длина плазмиды pBR322 – 4361 пар нуклеотидов (п. н.). Она несет гены устойчивости к антибиотикам ампициллину (Ap^r) и тетрациклину (Tc^r) и сигнал начала репликации (*ori*), обеспечивающий репликацию только в клетках энтеробактерий. В плазмиде имеются уникальные сайты рестрикции для *Bam*HI и *Sal*I в гене Tc^r , один *Pst*I-сайт – в гене Ap^r . Следует иметь в виду, что встраивание в плазмиду клонируемых фрагментов ДНК по сайтам рестрикции, расположенным в генах Ap^r и Tc^r , будет нарушать их целостность. По такому признаку легко различить

клетки, не содержащие плазмиды (не растут в присутствии Ap и Tc), клетки с плазмидой, не содержащей вставки (растут в присутствии обоих антибиотиков) и клетки с рекомбинантными плазмидами (в зависимости от локализации вставки растут на среде с одним из антибиотиков).

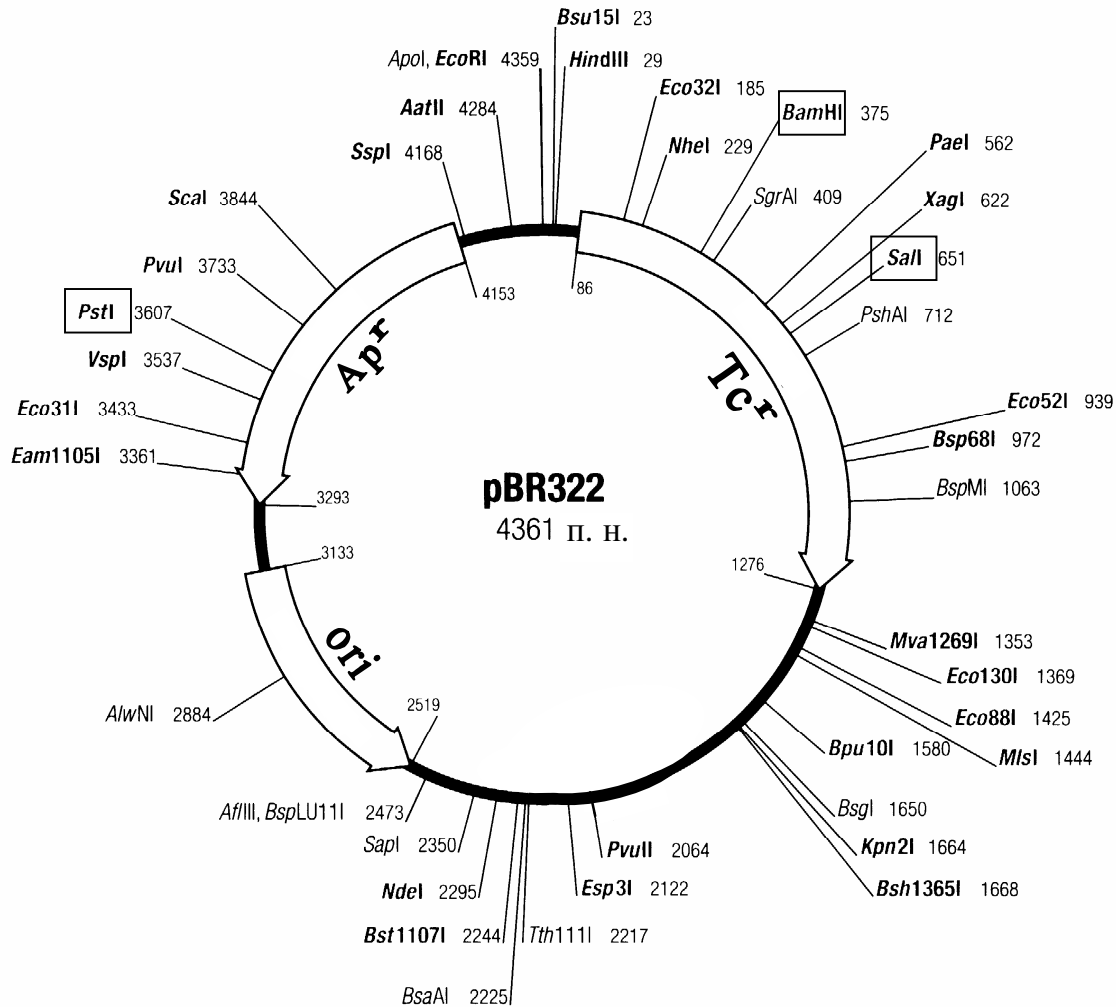


Рис. 3. Генетическая карта плазмидного вектора pBR322

Помимо генов устойчивости к антибиотикам в качестве селективируемых маркеров используют гены различных ферментов, присутствие которых в клетках в составе плазмиды обнаруживают по соответствующей ферментативной активности. В векторе pUC18 таким маркером является ген N-концевой части β -галактозидазы, которая, связываясь с C-концевой частью (кодируется хромосомной ДНК), образует активную форму β -галактозидазы (рис. 4).

Последовательность полилинкера

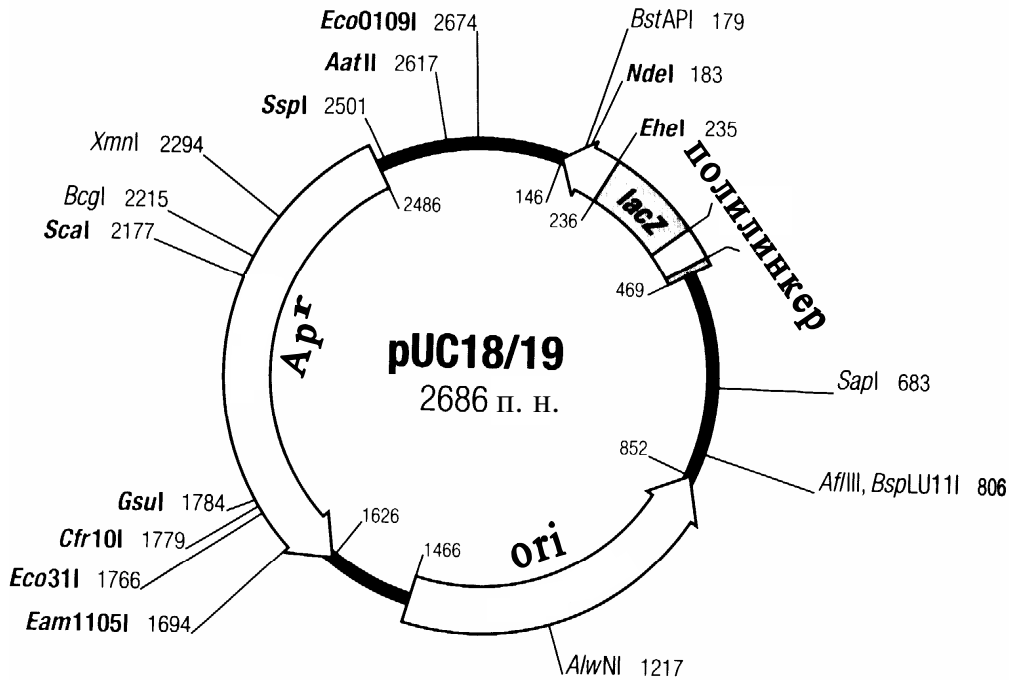
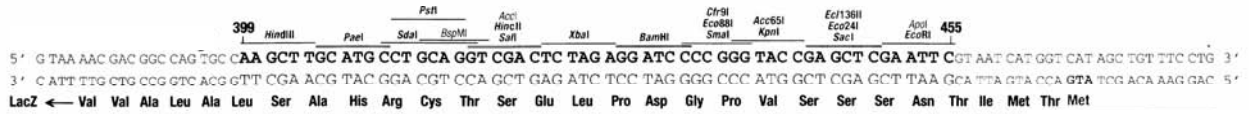


Рис. 4. Генетическая карта плазмидного вектора pUC18

Сайты рестрикции для клонирования ДНК локализованы в начале гена N-концевой части β -галактозидазы в составе полилинкера (синтетическая короткая последовательность с множеством уникальных сайтов рестрикции). Вставка чужеродной ДНК в полилинкер разрывает структурную часть гена N-концевой части β -галактозидазы, вследствие чего активная форма β -галактозидазы не образуется. Если же клетки будут трансформированы немодифицированной плазмидой pUC18, будет образовываться активная форма β -галактозидазы. Наличие в клетках β -галактозидазы можно зафиксировать по расщеплению хромогенного субстрата X-Gal, продукты гидролиза которого окрашивают колонии клеток в синий цвет, или по характеру окрашивания колоний на среде ЕМВ с лактозой. Поскольку плазида pUC18 одновременно содержит и ген устойчивости к ампициллину (Amp^r), отбор бактерий, несущих рекомбинантные плазмиды, можно проводить одновременно по этим двум маркерам. Известно, что эта плазида имеет размеры 2686 п. н., является

мультикопийной, стабильно наследуется и способна к репликации в широком круге грамотрицательных бактерий. Весьма немаловажным свойством этой плазмиды является то, что она легко выделяется в количествах, достаточных для трансформации и введения в реципиентные клетки бактерий.

На основе вектора pUC18 была сконструирована рекомбинантная плазида рНPr7, содержащая интактный ген *ptsH* бактерий *E. coli*, кодирующий общий компонент фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферной системы – белок НPr. Эта плазида была получена путем клонирования фрагмента хромосомы *E. coli*, содержащего ген *ptsH*, в область полилинкера вектора pUC18. Присутствие этой плазмиды будет комплементировать мутацию в клетках *E. coli* LBG 1605, дефектных по данному гену.

ПЛАН РАБОТЫ

- I. Используя бактерии *E. coli* XL1-Blue, несущие плазмиду рНPr7, выделить плазмидную ДНК.
- II. Осуществить трансформацию клеток *E. coli* LBG 1605 выделенной плазмидной ДНК.

ХОД РАБОТЫ

ЗАНЯТИЕ 1. Выделение ДНК плазмиды рНPr7

Для выделения плазмидной ДНК пользуются многими методами. Все они включают три основных этапа:

- 1) рост бактерий и амплификацию плазмиды;
- 2) сбор бактерий и их лизис;
- 3) очистку плазмидной ДНК.

Выращивание бактерий и амплификацию плазмиды осуществляют, как правило, в жидких полноценных средах в присутствии одного или нескольких антибиотиков, устойчивость к которым обусловлена генами плазмидной ДНК. Сбор бактерий осуществляют центрифугированием, после чего клетки ресуспендируют в буферных растворах, содержащих ингибиторы ДНКаз для предотвращения гидролиза ДНК. Эти же буферные растворы используют на всех этапах выделения плазмидной ДНК и для ее длительного хранения. В приведенной ниже методике в качестве ингибитора ДНКаз используется ЭДТА, хелатирующий двухвалентные катионы, входящие в активные центры ДНКаз.

В методах лизиса клеток и очистки плазмидной ДНК используют два основных различия между хромосомой и плазмидой:

- 1) хромосома *E. coli* по размеру больше ДНК плазмид;
- 2) основная масса хромосомной ДНК выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, а плазмидная ДНК – в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Каждая из комплементарных цепей плазмидной ДНК представляет ковалентно замкнутое кольцо, поэтому цепи нельзя отделить друг от друга (не разорвав одну из них) в тех условиях, при которых происходит разрыв водородных связей в хромосомной ДНК (при нагревании или в щелочных растворах). При охлаждении или возвращении к нейтральному рН замкнутые кольцевые молекулы вновь принимают нативную конформацию, в то время как хромосомная ДНК остается денатурированной. Кроме того, при лизисе клеток кипячением или щелочью наблюдается также денатурация большей части белков. Это позволяет на первом этапе лизиса клеток произвести как очистку плазмидной ДНК от хромосомной ДНК, так и очистку плазмиды от белков. Для более эффективного лизиса бактериальных клеток часто используют дополнительные реагенты, такие как лизоцим и ДСН (додецилсульфат натрия).

В дальнейших процедурах очистки плазмиды (если это необходимо) из препаратов ДНК удаляют оставшиеся белки и РНК. Для этих целей применяют методы высаливания белков, денатурации белков в присутствии фенола и хлороформа, расщепления РНК с помощью РНКаз и другие способы. Для получения сверхчистых препаратов ковалентно замкнутой кольцевой ДНК используют также метод равновесного ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия с последующим извлечением препарата ДНК из определенной зоны центрифужной пробирки. При выделении и очистке плазмидной ДНК используют также ее неспособность растворяться в ряде органических растворителей, таких как изопропанол и этиловый спирт.

В качестве источника для выделения плазмидной ДНК используют, как правило, бактерии *E. coli*, имеющие мутации в генах, ответственных за рекомбинацию. Это позволяет предотвратить рекомбинацию между гомологичными фрагментами хромосомы *E. coli* и клонированным фрагментом в составе плазмиды. В приведенной ниже методике для выделения плазмидной ДНК используется штамм *E. coli* XL1-Blue, имеющий мутацию в гене *recA*. Кроме того, у данного штамма есть устойчивость к налидиксовой кислоте и тетрациклину, что позволяет облегчить селекцию анализируемых клонов.

На основании вышеизложенного выделение плазмиды рНPr7 осуществляется следующим образом:

- бактерии *E. coli* XL1-Blue, несущие плазмиду рНPr7, выращивают в жидкой полноценной среде в условиях аэрации в течение 24 ч при плюс 37 °С в присутствии Ar₁₀₀;
- клетки из 1,5 мл культуры бактерий осаждают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 2 мин и ресуспендируют в 0,75 мл физиологического раствора;
- после повторного центрифугирования при тех же условиях клетки ресуспендируют в 0,1 мл буфера Р1;
- к суспензии добавляют 0,2 мл буфера Р2, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре до видимого лизиса клеток (но не более 5 мин);
- к смеси добавляют 0,15 мл буфера Р3, перемешивают и центрифугируют 2 мин при 10000 об/мин;
- супернатант переливают в чистую пробирку, добавляют к нему 0,9 мл 96 % диэтилового спирта и выдерживают как минимум 20 мин при минус 20 °С;
- осадок собирают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 5 мин, высушивают при комнатной температуре и растворяют в 30 мкл воды.
- выделенную ДНК сохраняют в холодильнике при минус 20 °С.

Состав используемых буферов приведен в табл. 4

Таблица 4

Буферные растворы, используемые для выделения плазмидной ДНК

Буфер Р1	Буфер Р2 (свежеприготовленный)	Буфер Р3
10 мМ трис-НСl (рН=8,0), 1 мМ ЭДТА (рН=8,0)	200 мМ NaOH; 1 % ДСН	3 М ацетатный буфер (рН=4,8)

ЗАНЯТИЕ 2. Трансформация штамма *E. coli* LBG 1605 плазмидой рНPr7

Наиболее часто используемый в генно-инженерных исследованиях процесс поглощения экзогенной ДНК бактериальными клетками, сопровождающийся приобретением ими новых генетических маркеров, называют генетической трансформацией. Поглощение ДНК в процессе

трансформации может осуществляться лишь компетентными клетками. Под компетентностью понимается такое состояние бактериальных клеток, при котором они способны сорбировать экзогенную ДНК на своей поверхности и поглощать ее, после чего ДНК может быть интегрирована в хромосому или может существовать в виде внехромосомного элемента. Для многих грамположительных бактерий компетентность является естественным свойством, выраженным на определенных этапах роста культуры. Они регулируют свою компетентность секретлируемыми внешними факторами компетентности (феромонами), а также экспрессией определенных генов, участвующих в развитии компетентности. Клетки *E. coli* не обладают природной компетентностью. Однако ввиду важности этого организма для молекулярной генетики были разработаны методы, придающие *E. coli* искусственную компетентность. В настоящее время установлено, что при низких температурах в присутствии двухвалентных катионов экзогенная ДНК может с высокой эффективностью проникать внутрь клеток *E. coli*. Частоту трансформации можно повысить при использовании теплового шока и другими способами. Предполагается, что в этих условиях нарушается целостность и структура липополисахаридного слоя бактериальных клеток, что может сопровождаться демаскировкой или повышением доступности каналов захвата, которые могут быть ассоциированы с местами взаимодействия внешней и внутренней мембран (мостики Байера). Еще более высокой эффективности трансформации достигают при использовании электропорации. Быстрая поляризация клеточных мембран при воздействии электрического поля высокой напряженности приводит к их обратимому повреждению (образованию пор). В это время происходит эффективный перенос экзогенных молекул ДНК внутрь клеток.

Трансформация бактерий *E. coli* LBG 1605 плазмидой рНPr7 осуществляется следующим образом:

- 1,5 мл культуры бактерий *E. coli* LBG 1605 в логарифмической стадии роста центрифугируют 30 с при 10000 об/мин, предварительно охладив культуру в течение 10 мин на ледяной бане;
- супернатант сливают, осадок клеток ресуспендируют в 0,75 мл раствора CaCl_2 (0,1M), охлажденного на ледяной бане;
- клеточную суспензию выдерживают 15 мин на ледяной бане, после чего ее центрифугируют 30 с при 10000 об/мин;
- супернатант сливают, осадок клеток ресуспендируют в 0,1 мл раствора 0,1M CaCl_2 ;

- к клеточной суспензии добавляют 20 мкл раствора ДНК плазмиды рНPr7 и выдерживают 10 мин на ледяной бане;
- далее клетки подвергают тепловому шоку в течение 2 мин при 42 °С и охлаждают 5–10 с на ледяной бане.

После этого для определения количества трансформантов суспензию трансформированных клеток высевают с помощью шпателя на поверхность агаризованной индикаторной среды ЕМВ, содержащей глюкозу и Ap₁₀₀: 10 мкл суспензии наносят на поверхность одной чашки и 100 мкл – второй.

В качестве контроля используют высев 100 мкл нетрансформированных клеток бактерий *E. coli* LBG 1605 на полноценную питательную среду, содержащую Ap₁₀₀.

Для определения количества реципиентных клеток на отдельную чашку со средой ЕМВ без антибиотика производят высев бактерий *E. coli* LBG 1605, взятых для трансформации из разведений 10⁻⁴ и 10⁻⁵. Бактерии выращивают при 37 °С в течение 48 ч.

ЗАНЯТИЕ 3. Учет результатов

Учитывают количество трансформантов, отмечая число колоний, выросших на двух чашках со средой ЕМВ и ампициллином и окрашенных в темный цвет, что свидетельствует об утилизации глюкозы.

Количественно определяют рост нетрансформированных клеток бактерий *E. coli* LBG 1605 на контрольной чашке с ампициллином.

Подсчитывают общее количество реципиентных клеток бактерий *E. coli* LBG 1605, выросших из разведений 10⁻⁴ и 10⁻⁵.

Полученные данные заносят в табл. 5.

Таблица 5

Количество полученных трансформантов и общее количество реципиентных бактерий, взятых для трансформации

Штамм Среда	<i>E. coli</i> LBG 1605	<i>E. coli</i> LBG 1605 + рНPr7
ЕМВ		
ЕМВ + глюкоза + Ap ₁₀₀		

Эффективность трансформации (в %) рассчитывают по формуле

$$\mathcal{E} = \frac{T}{P} \cdot 100 \%,$$

где \mathcal{E} – эффективность трансформации;

T – количество трансформированных клеток;

P – количество клеток реципиента, взятых для трансформации.

Вопросы для теоретической подготовки

1. Охарактеризуйте способы введения генетического материала в клетки бактерий.
2. Опишите принципы выделения плазмидной ДНК из клеток бактерий.
3. Дайте понятие векторных молекул и проведите сравнительный анализ векторов различного типа.
4. Опишите применение плазмиды pBR322 в качестве вектора.
5. Охарактеризуйте способы введения рекомбинантной ДНК в клетки грамотрицательных и грамположительных бактерий.

2.2. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ КАРОТИНОГЕНЕЗА *PANTOEA AGGLOMERANS* В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ β -КАРОТИНА

Витамины поставляются в организм с пищей или их назначают в форме лекарственных препаратов при определенных патологических процессах. Среди липидо- и водорастворимых витаминов известны реализованные биотехнологические процессы производства витаминов рибофлавина (витамин В₂), аскорбиновой кислоты (витамин С), цианкобаламина (витамин В₁₂), витаминов А₁ и D.

В качестве продуцентов рибофлавина могут быть бактерии, дрожжи и нитчатые грибы. Однако наиболее заманчивыми являются те штаммы, которые образуют на жидких средах 0,5 г и более рибофлавина на 1 л среды. К подобным организмам относятся грибы *Ashbyii gossypii*, *Eremothecium ashbyii* и *Candida guilliermondii*. Методами генной инженерии удалось получить штамм сенной палочки, образующий около 6 г рибофлавина в 1 л среды.

В производстве аскорбиновой кислоты участвуют определенные виды уксуснокислых бактерий, способных к биосинтезу полупродукта этой кислоты – L-сорбозы из сорбита. Последние стадии процесса включают

химический синтез. Таким образом, весь процесс производства аскорбиновой кислоты является химико-ферментативным.

Цианкобаламин получают только микробиологическим синтезом. Его продуцентом являются прокариоты и, прежде всего, пропионовые бактерии, которые в естественных условиях образуют большое количество этого витамина.

Витамин D – это группа родственных соединений, в основе которых находится эргостерин, обнаруженный в клеточных мембранах эукариот. Поэтому для получения витамина D используют пекарские или пивные дрожжи. Содержание эргостерина в дрожжевых клетках колеблется в пределах 0,2–11 %. Кроме дрожжей продуцентами эргостерина могут быть мицелиальные грибы – аспергиллы и пенициллы.

Каротиноиды представляют собой один из наиболее широко распространенных и структурно разнообразных классов естественных жирорастворимых пигментов. В настоящее время описано приблизительно 600 химически различных каротиноидов. Многие эукариоты, включая все водоросли и высшие растения, а также некоторые грибы осуществляют синтез этих пигментов. Каротиноиды синтезируются и бактериохлорофилл-содержащими бактериями, осуществляющими anoxygenic photosynthesis, и хлорофилл-содержащими эубактериями, осуществляющими oxygenic photosynthesis, и нефотосинтезирующими эубактериями. В организмах, не образующих каротиноиды самостоятельно, например, млекопитающих, птиц, амфибий, рыб, ракообразных и насекомых каротиноиды выполняют важные биологические функции. В организме человека многие каротиноиды могут быть предшественниками витамина A, биологическая роль которого очень важна. Входя в состав сетчатки глаза, он в виде родопсина участвует в акте зрения. При его недостатке развивается «куриная слепота». Витамин A необходим для нормального состояния кожи и слизистых оболочек глаз, бронхов, желудка. Его недостаток ведет к воспалению верхних дыхательных путей и желудка (катарам, бронхитам, гастритам и язвам), воспалению и изъязвлению роговицы глаз, огрубению кожных покровов и потере ими эластичности. Кроме того, β -каротин является мощным антиоксидантом. Он обеспечивает в организме прерывание цепных свободнорадикальных реакций, защищает макромолекулы и биомембраны клеток от повреждений, являясь фактором повышения резистентности организма к различным патогенным воздействиям, в том числе и к новообразованиям. Такой эффект связан, вероятно, со способностью каротиноидов к прерыванию реакций перекисного окисления липидов.

Каротиноидные пигменты получают тремя различными способами:

- из природных источников (морковь, тыква);
- с помощью ферментации микробных штаммов;
- в результате химического синтеза.

Преимущество микробиологического способа получения каротиноидов состоит в том, что затраты на его осуществление в несколько раз ниже, чем при использовании в качестве источника получения каротиноидов природного материала.

Природными продуцентами каротиноидных пигментов являются бактерии *Pantoea agglomerans* (ранее имевшие видовое название *Erwinia herbicola*), обитающие на поверхности листьев здоровых растений, а также являющиеся возбудителями некротического заболевания груш и родственных плодовых деревьев.

Установлено, что у бактерий *Pantoea agglomerans* кластер генов *crt*, ответственных за биосинтез каротиноидов, может быть локализован на плазмиде или на хромосоме. Этот кластер включает шесть генов (*crtB*, *crtE*, *crtI*, *crtX*, *crtY*, *crtZ*), которые кодируют ферменты, необходимые для синтеза зеаксантин- β -D-дигликозида (рис. 5 и 6). Функция дополнительной открытой рамки считывания (ORF6) не идентифицирована.



Рис. 5. Организация генов биосинтеза каротиноидов у *Pantoea agglomerans*

Каротиноиды, стерины, убихиноны относятся к терпенам и имеют общий путь биосинтеза, а различия касаются главным образом конечных стадий биосинтеза. Таким образом, для продукции каротиноидов могут использоваться изначально не синтезирующие их микроорганизмы, несущие различные комбинации генов биосинтеза каротиноидов от разных хозяев. К таким организмам относятся бактерии *E. coli*, которые в норме не продуцируют каротиноиды, но способны к синтезу при амплификации в их клетках плазмид с кластером *crt* генов из *Pantoea agglomerans*. Использование этого вида бактерий в качестве продуцента каротиноидов связано с тем, что *E. coli* – один из наиболее изученных организмов. Получена исчерпывающая информация о его генетике, биохимии, физиологии, разработаны хорошие системы векторов для экспрессии чужеродной информации в клетках этого вида бактерий, подобраны питательные среды и условия культивирования.

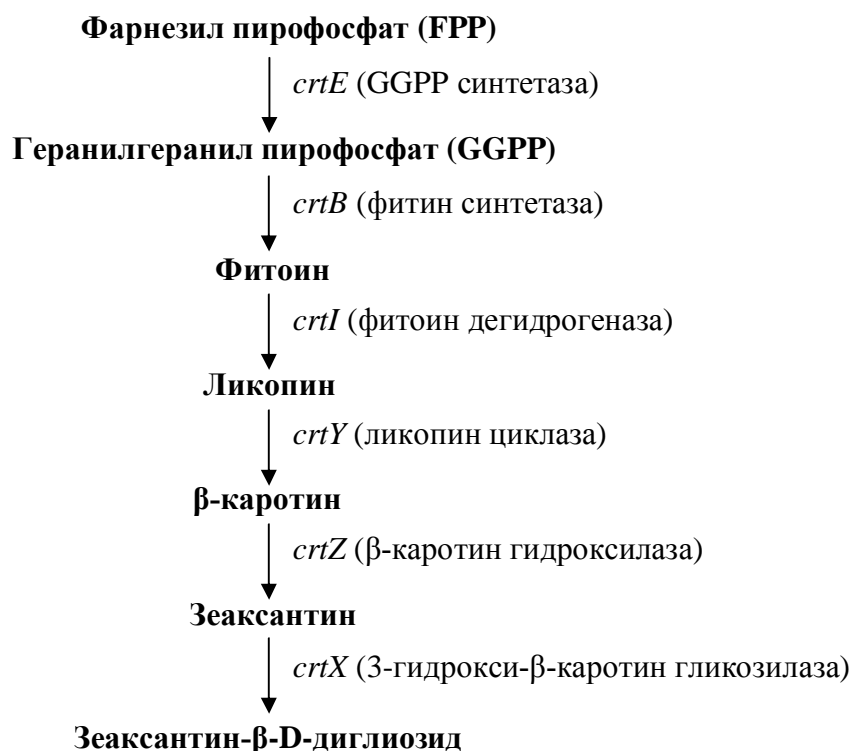


Рис. 6. Путь биосинтеза каротиноидов у бактерий *Pantoea agglomerans*

С использованием транспозона mini-Tn5Cm в хромосоме бактерий *Pantoea agglomerans* 206 была получена мутация в одном из генов *crt*-кластера (гене *crtZ*), что приводило к синтезу мутантными бактериями *Pantoea agglomerans* Δ CrtZ не зеаксантин- β -D-дигликозида, а промежуточного продукта – β -каротина –, имеющего промышленное значение. Путем клонирования мутантного кластера генов *crt* из хромосомы *Pantoea agglomerans* Δ CrtZ в вектор pBR322 была создана рекомбинантная плаزمида pCrt Δ CrtZ. Введение этой плазмиды в клетки *E. coli* HB101, которые характеризуются хорошей скоростью роста, будет приводить к синтезу бактериями β -каротина, уровень продукции которого можно определить спектрофотометрически.

ПЛАН РАБОТЫ

- I. Осуществить трансформацию клеток *E. coli* HB101 плазмидой pCrt Δ CrtZ.
- II. Провести сравнительное определение уровней продукции β -каротина клетками *Pantoea agglomerans* Δ CrtZ и *E. coli* HB101 (pCrt Δ CrtZ).

ХОД РАБОТЫ

ЗАНЯТИЕ 1. Трансформация клеток *E. coli* HB101 плазмидой pCrtΔCrtZ

Осуществляется по следующей методике:

- 1,5 мл культуры бактерий *E. coli* HB101 в логарифмической стадии роста центрифугируют 30 с при 10 000 об/мин, предварительно охладив культуру в течение 10 мин на ледяной бане;
- супернатант сливают, осадок клеток ресуспендируют в 0,75 мл раствора 0,1М CaCl₂, охлажденного на ледяной бане;
- клеточную суспензию выдерживают 15 мин на ледяной бане, после чего ее центрифугируют 30 с при 10 000 об/мин;
- супернатант сливают, осадок клеток ресуспендируют в 0,1 мл раствора 0,1М CaCl₂;
- к клеточной суспензии добавляют 20 мкл раствора ДНК плазмиды pCrtΔCrtZ и выдерживают 10 мин на ледяной бане;
- далее клетки подвергают тепловому шоку в течение 2 мин при 42 °С и охлаждают 5–10 сек на ледяной бане.

После этого суспензию трансформированных клеток высевают с помощью шпателя на поверхность полноценной агаризованной среды с антибиотиками (Ap₂₅Sm_{6,5}Sm₅₀): 10 мкл суспензии наносят на поверхность одной чашки и 100 мкл – второй.

Для определения количества реципиентных клеток на отдельную чашку с полноценной агаризованной средой без антибиотиков производят высев бактерий *E. coli* HB101, взятых для трансформации из разведений 10⁻⁴ и 10⁻⁵.

Бактерии выращивают при 28 °С в течение 48 ч (при 37 °С продукция каротиноидов в клетках *E. coli* снижена).

ЗАНЯТИЕ 2. Учет результатов, пересев колоний

Учитывают количество трансформантов, отмечая количество желто-пигментированных колоний, выросших и продуцирующих β-каротин на двух чашках с антибиотиками.

Подсчитывают общее количество реципиентных клеток бактерий *E. coli* HB101, выросших из разведений 10⁻⁴ и 10⁻⁵.

Полученные данные заносят в табл. 6.

Таблица 6

Количество полученных трансформантов и общее количество реципиентных бактерий, взятых для трансформации

Штамм Среда	<i>E. coli</i> HB101	<i>E. coli</i> HB101 + pCrtΔCrtZ
Полноценная среда		
Полноценная среда + Ap ₂₅ Cm _{6,5} Sm ₅₀		

Эффективность трансформации рассчитывают, как описано в п. 2.1.

Проводят пересев 3-х β-каротин продуцирующих колоний на поверхность полноценной агаризованной среды с антибиотиками (Ap₁₀₀Cm₂₅Sm₁₀₀) и инкубируют при 28 °С в течение 48 ч.

ЗАНЯТИЕ 3. Определение уровней продукции β-каротина клетками *Pantoea agglomerans* ΔCrtZ и *E. coli* HB101 (pCrtΔCrtZ)

Поскольку каротиноиды являются липидами, они растворимы в органических растворителях и могут быть экстрагированы из природных объектов полярными растворителями, такими как ацетон, хлороформ и спирты.

На основании этого выделение β-каротина из исследуемых клеток осуществляется следующим образом:

- штаммы *Pantoea agglomerans* ΔCrtZ и *E. coli* HB101 (pCrtΔCrtZ) засевают петлей в жидкую полноценную среду (10 мл) и выращивают в условиях аэрации в течение 24 ч при 28 °С (в среду для плазмидсодержащего штамма добавляют Ap₅₀Cm_{12,5});
- 5 мл культуры бактерий центрифугируют 5 мин при 7 000 об/мин и отмывают физиологическим раствором (5 мл);
- осадок клеток ресуспендируют в 2,5 мл диэтилового спирта и оставляют при минус 20 °С на 20 мин;
- осадок клеточного дебриса убирают центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, супернатант переносят в чистую пробирку.

Далее измеряют оптическую плотность (ОП) супернатанта при 460 нм (пик поглощения β-каротина). Поскольку исследуемые бактериальные культуры могут различаться по скорости роста и, соответственно, по ко-

личеству клеток, продуцирующих каротиноиды, измеряют ОП исходных бактериальных культур при 600 нм.

Расчет количества (С) β-каротина (в условных единицах) проводят по формуле:

$$C = \frac{ОП_{460}}{ОП_{600}}$$

Сравнивают количество β-каротина, продуцируемого бактериями *Pantoea agglomerans* ΔCrtZ и *E. coli* HB101 (pCrtΔCrtZ).

Вопросы для теоретической подготовки

1. Охарактеризуйте принципы подбора биотехнологических объектов.
2. Охарактеризуйте способы улучшения продуцентов.
3. Приведите примеры микробиологического производства лекарственных средств.

3. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК В БИОТЕХНОЛОГИИ

3.1. ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* В ГЕЛЕ АЛЬГИНАТА КАЛЬЦИЯ

Эффективность ферментативных процессов, используемых в самых различных областях человеческой деятельности, удалось увеличить с помощью иммобилизации ферментов. Иммобилизованные ферменты обнаруживают несколько преимуществ над своими растворимыми аналогами:

- 1) они могут быть отделены от продукта и использованы повторно, что снижает стоимость процесса;
- 2) иммобилизованные ферменты часто обнаруживают повышенную стабильность и длительно сохраняют активность;
- 3) они пригодны для непрерывных процессов, которые, в свою очередь, облегчают контроль за качеством и снижают стоимость труда;
- 4) время реакции может быть уменьшено за счет создания более высокого соотношения ферментов и субстратов;
- 5) можно создавать мультиферментные системы.

Однако применение ферментов ограничено из-за их низкой стабильности, способности катализировать только одну единственную реакцию, высокой стоимости чистых препаратов. Кроме того, для практических целей могут использоваться только те ферменты, для которых не требуется регенерации кофакторов. Поэтому в настоящее время наряду с иммобилизацией ферментов внимание исследователей все больше привлекает иммобилизация клеток и органелл. Живая клетка в отличие от фермента представляет собой готовый биотехнологический реактор, в котором реализуются не только процессы, приводящие к образованию конечного продукта, но и многие другие, способствующие поддержанию каталитической эффективности системы на высоком уровне (например, регенерация кофакторов). Поскольку ферменты функционируют в нативном окружении, их денатурация в процессе работы сводится к минимуму. Это расширяет число применяемых ферментов и позволяет осуществлять как процессы синтеза, так и процессы деградации.

Иммобилизованные клетки идеально подходят для использования в реакторах с перемешиванием, через которые пропускают субстрат. Преимуществом таких реакторов является возможность их многократного использования и получения продукта, свободного от фермента. Конечно, использование иммобилизованных клеток не лишено недостатков. Например, клеточная стенка или плазматическая мембрана могут препятствовать проникновению субстрата к ферменту или диффузии продукта из клетки. Кроме того, возникает необходимость поддержания целостности клеток и удержания их в той фазе роста, в которой синтезируются требуемые ферменты. Наконец, из-за большого числа присутствующих в клетке ферментов (что в ряде случаев рассматривается как достоинство) возможно протекание нежелательных побочных реакций.

Для иммобилизации клеток используется множество способов (сорбция инертными и ионообменными носителями, ковалентное связывание с полимерным носителем, включение в гель) и носителей разных типов (природные и синтетические полимеры и неорганические вещества). Включение живых клеток требует мягких условий иммобилизации, носитель при этом должен представлять собой систему открытых пор с хорошими условиями для газообмена. Следует принимать во внимание и возможное вредное влияние на жизнеспособность клеток сшивающих агентов. Наибольшее распространение получило включение клеток в полиакриламидный гель и гель альгината кальция.

Альгинат – основной структурный полисахарид бурых морских водорослей. В присутствии моновалентных катионов полисахарид образует вязкий раствор, тогда как в присутствии двухвалентных катионов, осо-

бенно кальция, наблюдается образование геля. Поскольку гель образуется в мягких условиях, в нем можно иммобилизовать живые клетки.

ПЛАН РАБОТЫ

- I. Осуществить иммобилизацию клеток *Pseudomonas fluorescens* в гель альгината кальция.
- II. Определить эффективность работы каталазы, оксидазы и нитратредуктазы у иммобилизованных клеток.

ХОД РАБОТЫ

Включение клеток *Pseudomonas fluorescens* в гель альгината кальция проводят по следующей методике:

- 3 мл ночной культуры бактерий *Pseudomonas fluorescens* центрифугируют 5 мин при 7 000 об/мин и ресуспендируют в физиологическом растворе (1,5 мл);
- осторожно смешивают 1,5 мл клеточной суспензии с 1,5 мл 4 % раствора альгината натрия;
- с помощью стеклянной пипетки (объемом 1–2 мл) полученную смесь скапывают с высоты около 20 см в чашку Петри с 0,2 М раствором CaCl_2 ;
- оставляют частицы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе CaCl_2 на 5 мин для затвердевания.

Для определения каталазы несколько сферических частиц с иммобилизованными клетками с помощью пинцета помещают в пробирку с перекисью водорода (3 % раствор). Эффективность работы каталазы оценивают по интенсивности образования пузырьков водорода.

Определение оксидазы осуществляют с 1 % раствором N'N'-диметилпарафенилендиаминдигидрохлорида (DMPA). Несколько частиц с клетками помещают в пробирку с DMPA и выдерживают при перемешивании (37 °С) 15 мин. О наличии оксидазы будет свидетельствовать окрашивание раствора в розовый цвет.

Для определения наличия нитратредуктазы несколько частиц с клетками помещают в пробирку с 1 мл азотнокислого натрия или калия (1 % раствор). Пробирку инкубируют при перемешивании в течение 15 мин при 37 °С. Затем в пробирку вносят 1 мл реактива Грисса (1 % раствор). Учитывают реакцию на нитриты: в течение 3–5 мин появляется красное окрашивание.

Вопросы для теоретической подготовки

1. Охарактеризуйте способы иммобилизации клеток и ферментов.
2. Приведите примеры успешного применения иммобилизованных клеток и ферментов в практике.
3. Опишите преимущества и недостатки иммобилизации клеток и ферментов по сравнению с использованием бактериальных культур и очищенных ферментов.

4. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ

4.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ХЛЕБОПЕЧЕНИИ

Хлеб является одним из основных продуктов питания. Изготовление его представляет собой сложный цикл микробиологических и биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки с водой и заканчивая его выпечкой. В состав муки, используемой для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, входят компоненты, необходимые для развития многих микроорганизмов. Кроме крахмала в муке имеется до 2 % сбраживаемых сахаров – глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы. Мука хороших сортов пшеницы содержит до 14 % белка. Ее азотсодержащие вещества представлены разнообразными группами белков – альбуминами, глобулинами и др. Мука содержит до 2 % жиров и жироподобных веществ и до 2 % минеральных веществ, в том числе микроэлементы.

Решающую роль в приготовлении хлеба наряду с ферментами муки играет жизнедеятельность микроорганизмов. Мука всегда содержит значительное количество различных микроорганизмов. Их число зависит от степени загрязненности зерна и способов его очистки. Вносят микроорганизмы и с добавками к тесту в процессе приготовления хлеба. Однако из всего разнообразия микроорганизмов теста наиболее важное значение имеют дрожжи и молочнокислые бактерии, для развития которых в тесте есть все необходимые условия – влажность 40–50 %, незначительное содержание молекулярного кислорода и наличие питательных веществ. Ведущая роль в формировании качества хлеба принадлежит дрожжам. Их главная функция состоит в заквашивании теста, в результате чего оно поднимается под действием выделяющегося при брожении углекислого газа. Микробиологические процессы и связанные с ними биохимические изменения в тесте определяют пористость, окраску и сохранение свежести.

сти хлеба, придают ему вкус и аромат, несколько повышают его питательную ценность.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* различных рас являются главными разрыхлителями теста. Для хлебопечения особенно важны такие свойства дрожжей, как высокая потенциальная активность гликолитических ферментов, стойкость их хранения, способность переносить высокие концентрации сахаров и NaCl в среде. В хлебопечении чаще всего используют быстрорастущие расы сахаромецетов верхового брожения. У полноценных рас дрожжей подъемная сила, т. е. длительность подъема теста на стандартную высоту 70 мм в стандартной форме, должна быть не более 45 мин. Дрожжи должны иметь 100 %-ю устойчивость к мелассе и скорость роста не менее $0,2 \text{ ч}^{-1}$. На хлебозаводах применяют прессованные и сухие дрожжи.

Схема приготовления жидких дрожжей из прессованных и сухих включает в зависимости от сорта хлеба заквашивание осахаренной и охлажденной до $50 \text{ }^\circ\text{C}$ мучной заварки молочнокислыми бактериями, например *Lactobacillus delbrueckii*. Они ускоряют процесс брожения в тесте и обладают высокой протеолитической активностью, которая позволяет накапливать в тесте значительное количество аминного азота, положительно влияющего на скорость роста и подъемную силу дрожжей. Наряду с сахаромецетами в тесто могут спонтанно попадать дрожжи родов *Candida* и *Pichia* – *C. krusei*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*, *P. xylosa*, *P. vini*. В пшеничных и ржаных заквасках преобладают молочнокислые бактерии, а не дрожжи.

ПЛАН РАБОТЫ

- I. Получить дрожжевое тесто путем смешивания дрожжей и муки.
- II. Определить подъемную силу дрожжей.

ХОД РАБОТЫ

Получение дрожжевого теста проводят по следующей методике:

- в мерный стакан на 100 мл вносят 3,2 г прессованных дрожжей и немного воды;
- стеклянной палочкой дрожжи хорошо растирают до исчезновения комков, затем доливают до метки воду (температура $30 \text{ }^\circ\text{C}$) и вновь хорошо размешивают;
- в фарфоровую чашку переносят 5 мл полученной дрожжевой суспензии;

- прибавляют 8 г пшеничной муки второго сорта и замешивают тесто, придав ему форму шарика. Приготовление теста и шарика следует делать быстро, не более 4 мин;
- шарик опускают в стакан на 200 мл, наполненный водой (температура 30 °С);
- отмечают время, прошедшее с момента погружения шарика на дно стакана, до момента его всплытия на поверхность воды.

Очень хорошие дрожжи имеют подъемную силу 10–15 мин, хорошие дрожжи – 15–20 мин.

Вопросы для теоретической подготовки

1. Опишите свойства дрожжей, важные для хлебопечения.
2. Приведите примеры микроорганизмов, вызывающих «болезни» хлеба.

4.2. МИКРООРГАНИЗМЫ И ПРОИЗВОДСТВО МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Молочнокислые бактерии широко распространены в природе и используются во многих биотехнологических процессах, связанных с производством молока и кисломолочных продуктов. Средой обитания этих бактерий является молоко, молочные продукты, поверхность растений, ризосфера и прикорневая зона. Вместе с растениями молочнокислые бактерии попадают в желудочно-кишечный тракт человека и животных, составляя его микрофлору. Бактерии рода *Bifidobacterium* преобладают в кишечнике грудных детей, особенно вскармливаемых грудью, поскольку эти бактерии нуждаются в углеводах, содержащих N-ацетилглюкозамин, который найден только в женском молоке. Обнаружены они и в кишечной флоре взрослых людей, а также в гниющем иле.

Основным свойством молочнокислых бактерий, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. Молочнокислое брожение осуществляют бактериальные организмы, гетерогенные по морфологии, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

Молочнокислые бактерии по характеру продуктов сбраживания гексоз (глюкоза, фруктоза, манноза, галактоза), дисахаридов (лактоза, маль-

тоза, сахароза) и полисахаридов (декстрин, крахмал) относят к гомоферментативным и гетероферментативным.

В основном молочнокислые бактерии культивируют на средах с шестиуглеродными сахарами, но они могут также сбраживать некоторые пятиуглеродные сахара, сахароспирты, органические кислоты и полисахариды.

Отличительным признаком молочнокислых бактерий является высокая потребность в сложных питательных средах, определенных аминокислотах, витаминах, особенно группы В. Наиболее важным источником энергии для молочнокислых бактерий являются моно- и дисахариды – глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза. В качестве источника энергии и в конструктивном обмене используют также органические кислоты: лимонную, яблочную, пировиноградную, фумаровую и др. Свойство сбраживать различные сахара и органические кислоты, в частности рибозу, цитрат или ацетат, лежит в основе отличительных тестов для идентификации молочнокислых бактерий.

Физиологической особенностью молочнокислых бактерий является их кислотоустойчивость как следствие характерного для них энергетического обмена. Кокковые формы могут развиваться в нейтральных и щелочных средах, большинство же палочковидных форм не способны расти в среде с рН выше 6,0; бифидобактерии не растут при рН выше 8,2. Рост всех молочнокислых бактерий продолжается до тех пор, пока в процессе брожения углеводов рН в среде не снизится до 5,0 и ниже. В результате жизнедеятельности гомоферментативных лактококков накапливается до 1 % молочной кислоты, а *Lactobacillus bulgaricus* – до 3,5 %.

Наиболее широкое применение молочнокислые бактерии нашли в производстве кисломолочных продуктов в пищевой промышленности. Гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии давно используются в хлебопечении. Их ассоциации с дрожжами, благоприятные для создания аромата, вкуса, пористости, окраски и свежести, называются заквасками. Молочнокислое брожение находится в основе силосования кормов и квашения овощей (капусты, огурцов), плодов, ягод (маслин, яблок) и т. д. Эти процессы протекают за счет естественных микроорганизмов, находящихся на заквашиваемом объекте. В последнее время используют специальные закваски, обеспечивающие проведение процессов в прогнозируемых режимах и с ожидаемыми результатами. Молочнокислыми продуктами являются различные сыры, получаемые из обезжиренного или цельного молока. Молочнокислые бактерии включают в разные композиции профилактических и лечебных препаратов: бифидумбактерин, бификол, колибактерин, лактобактерин. Первый из них состоит из

живых высушенных бифидобактерий определенного штамма, второй – из живых бифидобактерий и кишечной палочки, третий содержит живые кишечные палочки, четвертый представляет собой сочетание лиофильно высушенных лактобацилл (*L. fermenti* и *L. plantarum*). За рубежом изготавливают так называемый пробиотик «Ферлак», содержащий молочно-кислые бактерии с добавками витаминов А, D₃ и Е. Его смешивают с кормом и рекомендуют поросятам, телятам и птицам. С помощью молочнокислых бактерий в промышленности довольно широко используют получение молочной кислоты.

ПЛАН РАБОТЫ

- I. Определить количество молочной кислоты в кисломолочных продуктах.
- II. Определить степень бактериальной обсемененности молока и кисломолочных продуктов.

ХОД РАБОТЫ

I. Определение количества молочной кислоты в кисломолочных продуктах.

Образование молочной кислоты является важнейшим признаком, по которому можно судить об эффективности молочнокислого брожения и соответственно о качестве получаемого кисломолочного продукта. Количество молочной кислоты в исследуемой пробе определяют методом титрования раствором NaOH. Кислотность молока или кисломолочного продукта выражают в градусах Тернера (°Т) или процентах молочной кислоты. Так, 1 °Т соответствует 1 мл 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование 100 мл исследуемой среды. Поскольку известно, что молекулярная масса молочной кислоты составляет 90, то для приготовления 1 л 1 н. раствора требуется 90 г кислоты, значит, в 1 мл 0,1 н. раствора содержится 0,009 г кислоты, что равно 1 °Т. Для каждого из производимых молочной промышленностью продукта существуют нормы по кислотности, утвержденные Министерством здравоохранения, свидетельствующие о качестве продукта.

Определение количества молочной кислоты проводят по следующей методике:

- исследуемый образец (молоко, кефир, сметана, сливки, культура молочнокислых бактерий и т. д.) смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1 : 3, центрифугируют 5 мин при 12 000 об/мин, супернатант сливают в чистую пробирку;

- 10 мл исследуемого супернатанта помещают в колбу Эрленмейера;
- к пробе добавляют 1–2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски;
- определяют объем затраченного на титрование 0,1 н. раствора NaOH, определяют количество молочной кислоты в °Т.

Допустимые нормы кислотности в °Т продуктов молочной промышленности приведены в табл. 7.

Таблица 7

Показатели качества кисломолочных продуктов

Продукт	Кислотность (в °Т)
Молоко	16–18
Ацидофилин	75–130
Ряженка	85–150
Варенец	75–120
Йогурт	85–150
Мацони	75–120
Кефир	70–120
Творог	240
Сметана	60–100
Сливки	17–18
Кумыс	60–120

На основании полученных данных делают заключение о качестве исследуемого продукта.

II. Определение степени бактериальной обсемененности молока и кисломолочных продуктов.

Молоко – благоприятная среда для развития микроорганизмов, поэтому при соответствующих температурных условиях микроорганизмы в нем бурно размножаются. В молоке содержатся белки, свободные аминокислоты, небольшое количество пептона, жиры, сахара, витамины (А, Е, D, С, группы В) и др. Попадание в него микроорганизмов происходит при дойке с поверхности вымени, с кожи животного, посуды, оборудования, кормов, рук и одежды доильщика. При соблюдении санитарных правил в молоке преобладают микрококки, молочнокислые бактерии, стрептококки, сарцины. Загрязненное молоко содержит значительное количество бактерий группы кишечной палочки, а также гнилостных и маслянокислых бактерий. Во время его хранения изменяется количество содержащихся в нем бактерий и соотношение между отдельными их видами. Характер этих изменений зависит от продолжительности, темпера-

туры хранения и состава микрофлоры в молоке в начале его хранения. При микробиологическом анализе молока определяют общую численность бактерий, титр кишечной палочки и проводят пробу на редуктазу.

Количество редуктазы в молоке является показателем его бактериальной обсемененности. В молоке содержатся различные ферменты, в том числе редуктаза – анаэробная дегидрогеназа, передающая водород от окисляемого субстрата любому ненасыщенному соединению, но неспособная передавать его кислороду воздуха. Редуктаза накапливается в молоке главным образом при размножении в нем микроорганизмов, поэтому ее количество является показателем бактериальной обсемененности молока. Обнаруживается редуктаза по обесцвечиванию метиленовой сини или резазурина.

Определение количества редуктазы в молоке с резазурином проводят по следующей методике:

- в стерильные пробирки наливают 10 мл анализируемого молока, 1 мл 0,0005 % водного раствора резазурина;
- содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают в термостат на 38–40 °С;
- учитывают изменение окраски через 20 мин и через 1 ч.

Полученные результаты сравнивают с данными, приведенными в табл. 8.

Таблица 8

Классификация молока по редуктазной пробе с применением резазурина

Качество молока	Количество бактерий (млн / мл)	Продолжительность изменения цвета, мин	Окраска молока
Хорошее	Менее 0,5	60	Сине-стальная
Удовлетворительное	0,6–4,0	60	Сине-фиолетовая или сиреневая
Плохое	4,0–20,0	60	Розовая или белая
Очень плохое	Более 20,0	20	Белая

Делают заключение о качестве исследуемого молока.

Вопросы для теоретической подготовки

1. Опишите особенности физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий.
2. Опишите свойства, которые необходимо учитывать при определении качества молока и кисломолочных продуктов.

УЧЕБНАЯ ПРОГРАММА КУРСА «ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология как межотраслевая область научно-технического прогресса и раздел практических знаний. Основные факторы, обусловившие стимул в развитии современной биотехнологии. Связь биотехнологии с биологическими, химическими, техническими и другими науками. Практические задачи биотехнологии и важнейшие исторические этапы ее развития. Области применения достижений биотехнологии. Трехкомпонентность современной биотехнологии.

Основные тенденции и перспективные направления развития биотехнологии в Республике Беларусь.

ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Объекты биотехнологии, основные требования к их применению. Микроорганизмы (бактерии и высшие протисты) – основные объекты биотехнологии. Штаммы микроорганизмов, используемые в биотехнологии, их преимущества. Принципы подбора биотехнологических объектов. Промышленные, модельные и базовые микроорганизмы. Требования к продуцентам, используемым в биотехнологическом производстве.

Выделение и селекция микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ. Методические подходы к улучшению штаммов промышленных микроорганизмов. Характеристика мутантных клеток и особенности их использования.

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Генетические способы улучшения продуцентов: организменный, клеточный и молекулярный уровни. Получение продуцентов путем ступенчатого отбора случайных мутаций и отбор продуцентов с заданным фенотипом.

Генетическая инженерия и технология рекомбинантных ДНК. Основные открытия, теоретически обосновавшие технологический подход к наследственной информации.

Инструменты генетической инженерии. Характеристика ферментов, используемых в генетической инженерии. Рестрицирующие эндонуклеазы, их основные характеристики и область применения. Методы соеди-

нения клонируемых фрагментов и векторных молекул. Выделение фрагментов ДНК.

Характеристика и особенности векторных молекул. Векторные системы, применяемые для клонирования в клетках прокариотических организмов. Типы векторов: плазмидные и фаговые, космиды и фазмиды. Классификация векторов. Упаковочная система бактериофага лямбда и область ее применения. Особенности клонирования в клетках грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Банки генов и клонотеки геномов.

Векторные системы для клонирования в клетках эукариот: животных, растительных и дрожжевых.

Стратегия клонирования и экспрессия чужеродной генетической информации в клетках различных организмов.

Способы введения рекомбинантных ДНК в клетки различных организмов. Поиск клонов с рекомбинантной ДНК. Общая схема эксперимента по генетической инженерии.

СЫРЬЕВАЯ БАЗА БИОТЕХНОЛОГИИ

Требования, предъявляемые к питательным субстратам, используемым в биотехнологических процессах. Основные типы питательных сред, используемых в биотехнологии; требования к составу и качеству, принципы подбора.

Сырьевая база биотехнологии. Питательные среды для ферментационных процессов. Природные сырьевые субстраты растительного происхождения. Отходы производства как потенциальные субстраты для культивирования биологических объектов.

ТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

Устройство и основные конструкторские детали ферментеров и биореакторов. Системы пеногашения, теплообмена, аэрирования и перемешивания, асептики и стерилизации, используемые в ферментерах. Специализированные ферментационные технологии: аэробные, анаэробные, газофазные и др.

Типы и режимы ферментаций: периодические и непрерывные. Хемостаты и турбидостаты. Твердофазная ферментация. Особенности получения целевых продуктов при различных условиях ферментации. Принцип масштабирования технологических процессов: лабораторные, пилотные и промышленные установки.

Основные параметры роста культур: время генерации, удельная скорость роста, выход биомассы, экономический коэффициент. Кривая роста популяции клеток, характеристика отдельных фаз и получение целевых продуктов. Зависимость выхода конечного продукта от потребленного субстрата.

Особенности культивирования биологических объектов. Культивирование клеток высших растений, примеры получаемых продуктов. Культивирование клеток животных, получение моноклональных антител.

КОНЕЧНЫЕ СТАДИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Конечные стадии получения целевого продукта. Отделение биомассы: флотация, фильтрование и центрифугирование. Методы дезинтеграции клеток. Выделение целевого продукта: осаждение, экстрагирование, адсорбция, электрохимические методы, ионообменная хроматография и др. Стадии концентрирования, обезвоживания, модификации и стабилизации целевых продуктов биотехнологических процессов.

Классификация продуктов биотехнологического производства.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ФЕРМЕНТЫ

Иммобилизованные клетки и ферменты, преимущества их использования в биотехнологии. Характеристика используемых носителей, способы иммобилизации клеток и ферментов.

Технология производства ферментов в промышленных условиях, требования, предъявляемые к продуцентам ферментов.

Инженерная энзимология как современное направление биотехнологии.

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Методы культивирования клеток высших организмов.

Каллусные и суспензионные культуры клеток высших растений, методы их получения и область применения. Протопласты растительных клеток, их получение, методы регенерации и культивирования. Слияние протопластов растительных клеток. Гибридизация соматических клеток растений.

Культивирование клеток и тканей животных. Приемы культивирования в суспензионной культуре и в адгезированном состоянии. Требова-

ния к качеству и составу питательных сред. Первичные и перевиваемые культуры.

Получение трансгенных организмов.

ДОСТИЖЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Производство белка одноклеточных организмов. Продуценты белка. Понятие «скора». Требования к белку одноклеточных организмов, возможности его использования.

Биотехнология и медицина. Получение антибиотиков в промышленных условиях. Другие лекарственные препараты, получаемые в промышленных условиях (вакцины, пробиотики и т. д.).

Биотехнологические способы получения энергоносителей.

Биотехнология и окружающая среда. Экологическая биотехнология. Биотехнология очистки промышленных отходов.

Социальные аспекты биотехнологии и биоинженерии. Контроль применения биотехнологических методов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ КСР ПО КУРСУ «ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»

- 1. Выберите наиболее полное определение биотехнологии:**
 - а) наука о промышленном получении биологически активных веществ;
 - б) наука об использовании биологических объектов в промышленности;
 - в) наука об использовании биологических объектов для получения биологически активных веществ и об охране окружающей среды;
 - г) наука, использующая достижения генетической, клеточной инженерии и других биологических и смежных наук для создания штаммов-продуцентов биологически активных веществ;
 - д) наука, использующая результаты фундаментальных исследований в области биологических, химических и технических дисциплин.

- 2. Слияние может быть использовано при получении организмов с заданными свойствами:**
 - 1) для протопластов микроорганизмов;
 - 2) клеток животных;

- 3) клеток растений;
- 4) клеток дрожжей;
- а) 1, 3; б) 2, 3, 4; в) 1,2; г) 1, 2, 3; д) 1, 4; е) все ответы верны.

3. В случае ник-трансляции речь идет об использовании фермента:

- а) рестриктазы;
- б) фосфатазы;
- в) ДНК-полимеразы I;
- г) трансферазы.

4. Отбор случайных мутаций может быть использован:

- а) если известен путь синтеза данного продукта;
- б) путь синтеза продукта неизвестен;
- в) выявлена строгая зависимость между продукцией вещества и фенотипом;
- г) все ответы верны.

5. Штаммы микроорганизмов, продуцирующие аминокислоты, могут быть созданы с использованием:

- а) мутагенеза, конъюгации;
- б) мутагенеза, слияния протопластов;
- в) размножения спорами, трансформации;
- г) все ответы верны;
- д) правильного ответа нет.

6. Трехкомпонентность современной биотехнологии заключается:

- а) в решении задач генетической инженерии, клеточной инженерии, инженерной энзимологии;
- б) получении трех форм товарной продукции;
- в) экономической эффективности процессов, спросе на биотехнологическую продукцию, сведениях о физиологии и генетике биологического объекта;
- г) все ответы верны.

7. Секретирующим векторам свойственно:

- а) экспрессировать клонированные гены в клетках про- и эукариот;
- б) секретировать продукты клонированных генов из клетки;
- в) наследоваться в клетках различных хозяев;

г) интегрироваться в хромосому.

8. Лигирование в генетической инженерии – это:

- а) любой процесс с участием ДНК-лигаз;
- б) ковалентное соединение концов ДНК;
- в) соединение любых фрагментов ДНК;
- г) все ответы верны;
- д) правильного ответа нет.

9. Векторная молекула – это:

- а) плаزمида бактерий, которая способна передаваться в клетки;
- б) рекДНК, которая легко вводится в клетку;
- в) любая ДНК, которая способна переносить чужеродные фрагменты ДНК;
- г) ДНК, которая стабильно наследуется в клетке;
- д) многокопийная плазмида;
- е) все ответы верны.

10. В упаковочную систему бактериофага λ , используемую в генной инженерии, входят:

- а) белки капсида + фаговая ДНК + АТФ;
- б) белки капсида + рекДНК + АТФ;
- в) белки капсида + рекДНК + фаговая ДНК;
- г) все ответы верны.

11. Секвенирование – это:

- а) химико-ферментативный синтез гена;
- б) определение последовательности оснований в ДНК;
- в) разделение ДНК на фрагменты и получение банка генов;
- г) клонирование генов;
- д) разделение ДНК на фрагменты.

12. Мутантные клетки, устойчивые к аналогам соединений, получают:

- а) высеvom клеток на полноценную среду с аналогом;
- б) высеvom клеток на минимальную среду с аналогом;
- в) обработкой мутагеном и высеvom клеток на среду любого состава;
- г) другим путем.

13. Метод получения генетических рекомбинантов у микроорганизмов заключается в использовании:

- а) конъюгации, трансформации, трансдукции;
- б) полового процесса у дрожжей, трансформации, слияния протопластов;
- в) слияния протопластов, трансформации, трансдукции;
- г) все ответы верны.

14. Основными свойствами протопластов являются:

- 1) наличие остатков клеточной стенки;
 - 2) способность к слиянию;
 - 3) поддержание жизнеспособности в гипертонической среде;
 - 4) поддержание жизнеспособности в гипотонической среде;
 - 5) способность к регенерации клеточной стенки;
 - б) способность к реверсии.
- а) 1, 2, 4, 5; б) 2, 3, 4, 5; в) 1, 3, 4, 5; г) 2, 3, 5, 6.

15. Выберите наиболее полное определение генетической инженерии (ГИ):

- а) ГИ – использование ферментов для конструирования клеток;
- б) ГИ – получение трансгенных растений и животных;
- в) ГИ – совокупность методов для создания организмов *in vitro*;
- г) ГИ – совокупность методов работы *in vitro*.

16. Основными требованиями к продуцентам являются:

- 1) способность к росту на дешевых субстратах;
 - 2) стабильность в отношении продукции интересующего вещества;
 - 3) наличие плазмид;
 - 4) наличие клеточной стенки грамположительного типа;
 - 5) высокая скорость роста;
 - б) наличие клеточной стенки грамотрицательного типа.
- а) 1, 2, 5; б) 2, 4, 5; в) 1, 2, 3; г) 1, 3, 6; д) 1, 5, 6.

17. К суперпродуцентам белка можно отнести штаммы, которые синтезируют:

- а) на 10 % больше данного продукта;
- б) в 2 раза больше данного продукта;
- в) не менее чем на 1–2 % больше данного продукта;
- г) нет правильного ответа.

18. Штамм – продуцент лизина – получен у бактерий:

- а) *Corynebacterium*;
- б) *Escherichia*;
- в) *Pseudomonas*;
- г) *Bacillus*.

19. Белок одноклеточных организмов относится к продуктам:

- а) тонкого синтеза;
- б) крупнотоннажного синтеза;
- в) маломасштабного синтеза.

21. Для периода управляемого биосинтеза в развитии биотехнологии характерно:

- а) производство антибиотиков;
- б) получение биотехнологических продуктов при использовании брожений;
- в) получение аминокислот и ферментов с использованием биообъектов;
- г) получение трансгенных растений и животных;
- д) получение моноклональных антител.

22. Вторичные метаболиты могут синтезироваться на следующих стадиях роста культуры:

- 1) логарифмической;
 - 2) стационарной;
 - 3) фазе отмирания;
 - 4) конец экспоненциальной – стационарной;
 - 5) стационарной – фазе отмирания.
- а) 1, 2, 4; б) 1, 3, 5; в) 2, 3, 5; г) 2, 3, 4; д) 2, 4, 5

23. Для получения продуцентов первичных метаболитов можно воспользоваться:

- 1) мутагенезом исходного штамма;
 - 2) ступенчатым отбором с применением мутагена;
 - 3) выращиванием клеток на среде без данного метаболита;
 - 4) выращиванием клеток в условиях снижения концентрации метаболита.
- а) 1, 2; б) 1, 3; в) 1, 4; г) 2, 3; д) 2, 4.

24. Для получения фрагментов ДНК в генетической инженерии используются:

- а) ДНК-полимеразы;
- б) экзонуклеазы;
- в) рестриктазы;
- г) фосфатазы;
- д) трансферазы.

25. Коннекторный способ соединения фрагментов ДНК заключается:

- а) в использовании фрагментов ДНК с сайтами узнавания для рестриктаз;
- б) присоединении синтезированных двунитевых последовательностей к ДНК с прямыми концами;
- в) обработке тупых концов ДНК экзонуклеазами и добавлении комплементарных нуклеотидов;
- г) лигировании по комплементарным последовательностям.

26. Химико-ферментативный синтез гена проводят в следующей последовательности:

- а) секвенируют ген – синтезируют нуклеиновую кислоту – синтезируют продукт;
- б) по структуре продукта определяют последовательность оснований в ДНК – синтезируют ген;
- в) разделяют ДНК на фрагменты – получают однонитевые фрагменты – достраивают вторую нить – проводят выделение гена;
- г) получают однонитевые фрагменты – разделяют ДНК на фрагменты – проводят выделение гена – достраивают вторую нить.

27. При использовании в качестве вектора вируса SV40 необходимо:

- 1) учитывать размеры клонируемого фрагмента ДНК;
 - 2) использовать перmissive клетки;
 - 3) обеспечить наличие в векторе генов для Т-антигена и белков вирусного капсида;
 - 4) использовать линию COS-клеток;
 - 5) обеспечить наличие точки начала репликации.
- а) 1, 2, 3; б) 1, 3, 5; в) 1, 4; г) 2, 5; д) 1, 5.

28. Путем электропорации рекомбинантная ДНК может быть введена в клетки:

- а) растений;
- б) животных;
- в) микроорганизмов;
- г) в протопласты;
- д) в любые клетки;
- е) в любые клетки и протопласты.

29. Для поиска клонов с рекомбинантной ДНК могут быть использованы:

- а) прямая и непрямая селекция клеток, синтезирующих искомый продукт;
- б) иммунохимические и гибридизационные методы;
- в) прямая селекция, иммунохимические и гибридизационные методы;
- г) непрямая селекция, иммунохимические и гибридизационные методы;
- д) все вышеперечисленные методы.

30. Экономический коэффициент в биотехнологии – это:

- а) стоимость производства продукта, рассчитанная по отношению к стоимости продукта;
- б) отношение увеличения (прироста) биомассы, отнесенная к количеству потребленного субстрата;
- в) стоимость продукта, отнесенная к стоимости сырья.

Литература

Основная:

1. Биотехнология: В 8 кн. / под ред. Н.С. Егорова и В. Д. Самуилова. М., 1986.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М., 2002.
3. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для высш. педагог. учеб. заведений / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. М., 2003.
4. Евтушенков, А. Н. Введение в биотехнологию: курс лекций/ А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. Минск., 2004.

Дополнительная:

1. *Албертс, Б.* / Молекулярная биология клетки. / Б. Албертс [и др.]. М., 1994. Т.1–3.
2. *Воробьева, Л. И.* Промышленная микробиология: учеб. пособие / Л. И. Воробьева М., 1989.
3. *Ермишин, А. П.* Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин Минск., 2005.
4. *Аркадьева, З. А.* Промышленная микробиология: учеб. пособие для вузов / З. А. Аркадьева [и др.]; под ред. Н. С. Егорова. М., 1989.
5. *Сингер, М.* Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг М., 1998.
6. *Шевелуха, В. С.* Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. / В. С. Шевелуха [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. 2-е изд., перераб. и доп. М., 2003.
7. *Альтхерр, М.* Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования / М. Альтхерр, П. Балбас, Р. Берка М., 1991.
8. Современная микробиология: прокариоты. в 2 т. Т. 2 / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М., 2005.
9. *Бирс, Р.* Рекомбинантные молекулы: значение для науки и практики / Р. Бирс, Э. Бэсит М., 1980.
10. *Рыбчин, В. Н.* Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин СПб., 1999.
11. *Щелкунов, С. Н.* Генетическая инженерия: учеб.-справ. пособие / С. Н. Щелкунов, 2-е изд, испр. и доп. Новосибирск., 2004.
12. *Форстер, К. Ф.* Экологическая биотехнология / К. Ф. Форстер [и др.]. Л., 1990.