

**Н.М. Лисун, А.А. Сутягин**

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

**МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования**

**«ЮЖНО-УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ГУМАНИТАРНО-ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Н.М. Лисун, А.А. Сутягин**

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

**УЧЕБНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ**

Челябинск

2024

**УДК 577.1 (076)(021)**

**ББК 28.072я72**

**Л 63**

Лисун, Н.М. Лабораторные работы по биотехнологии: учебно-практическое пособие / Н.М. Лисун, А.А. Сутягин; Министерство просвещения Российской Федерации, Южно-Уральский государственный гуманитарно-педагогический университет. – Челябинск: Изд-во ЮУрГГПУ, 2024. – 88 с. – ISBN 978-5-907869-59-2. – Текст: непосредственный.

В пособии приведены лабораторные работы по всем основным разделам биотехнологии.

Издание предназначено для методического обеспечения лабораторных занятий по биотехнологии основной профессиональной образовательной программы по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки), направленность Биология. Химия (уровень образования бакалавр).

Для самостоятельной работы студентов по дисциплине предлагаются тесты и задачи разного уровня сложности. Задания, включенные в пособие, могут быть использованы студентами при прохождении педагогической практики для организации исследовательской деятельности обучающихся и подготовки к ЕГЭ по биологии.

Учебное пособие поможет учителям биологии и химии при проведении уроков, факультативных занятий; будет полезно учителям, работающим в классах с углубленным изучением биологии и химии, так как содержит задачи разного уровня сложности, в том числе формата ЕГЭ.

Рецензенты: Зырянова Ю.М., канд. биол. наук, доцент

Манжукова Л.Ф., канд. хим. наук, доцент

**ISBN 978-5-907869-59-2**

© Лисун Н.М., Сутягин А.А., 2024

© Издательство Южно-Уральского государственного гуманитарно-педагогического университета, 2024

## ВВЕДЕНИЕ

Развитие биотехнологии позволяет существенно интенсифицировать производство, повышать эффективность использования природных ресурсов, решать экологические проблемы, создавать 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 биотрансформационных 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 [2].

Цель создания пособия – обеспечить овладение учащимися основными практическими навыками управления процессами микробного синтеза, выделения и очистки продуктов, а также методами химического и биохимического контроля биотехнологических процессов. В лабораторных работах используются физико-химические методы исследования.

В издании представлен теоретический материал и ряд лабораторных работ, выполнение которых познакомит студентов с достижениями и разнообразными методами, используемыми в современной биотехнологии.

## **Раздел 1. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Ферменты играют жизненно важную роль в биотехнологии благодаря их способности катализировать биохимические реакции с большей скоростью, чем традиционные химические катализаторы. Ферменты широко используются в различных отраслях промышленности:

- производстве продуктов питания (для улучшения текстуры, вкуса и внешнего вида различных пищевых продуктов);
- текстильной промышленности (для повышения качества и долговечности тканей);
- фармацевтическом производстве (для катализации химических реакций, которые необходимы при производстве лекарств);
- производстве биотоплива (этанол и биодизельное топливо);
- восстановлении окружающей среды (для расщепления загрязняющих веществ на безвредные вещества).

Использование ферментов в биотехнологии имеет ряд преимуществ перед традиционными химическими катализаторами. Ферменты обладают высокой специфичностью, что означает, что они катализируют только определенную реакцию или набор реакций. Эта специфичность делает их использование высокоэффективным и сводит к минимуму риск нежелательных побочных реакций. Ферменты также биоразлагаемы и безвредны для окружающей среды, что делает их идеальными для использования в чувствительных к окружающей среде областях, таких как биоремедиация.

Ферменты играют решающую роль в биотехнологии благодаря их способности катализировать биохимические реакции с большей скоростью, чем традиционные химические катализаторы. Они широко используются в различных отраслях промышленности, таких как производство продуктов питания, текстильная промышленность, фармацевтическое производство, производство биотоплива и восстановление окружающей среды.

Использование ферментов в биотехнологии дает ряд преимуществ по сравнению с традиционными химическими катализаторами, такими как высокая специфичность, эффективность и экологичность. Поскольку биотехнология продолжает развиваться, вполне вероятно, что использование ферментов станет еще более распространенным в различных отраслях промышленности [3].

## 1. Методы определения ферментативной активности

### Общая характеристика методов определения ферментативной активности

Прежде чем приступить к определению ферментативной активности, необходимо избрать и тщательно продумать метод определения активности. Активность фермента меняется при различных условиях реакции и зависит от температуры, pH среды, от концентраций субстратов и кофакторов. Учитывая это, при определении активности фермента необходимо строго соблюдать одни и те же условия. Желательно не ограничивать определение активности одним каким-либо методом. Количество субстрата, превращаемого в условиях теста по определению активности фермента, должно быть пропорционально количеству последнего и времени инкубирования. Если же нет такой пропорциональности, то активность рассчитывают по предварительно построенному калибровочному графику, отражающему зависимость скорости реакции от количества единиц фермента. Когда ход реакции не линейен во времени, следует определять начальную скорость реакции (по тангенсу угла наклона касательной к начальному отрезку кривой превращения). Для этого легче всего применять такие методы изменения активности, которые позволяют непрерывно следить за ходом превращения во времени: спектрофотометрические методы, потенциометрические, полярографические и другие. Для измерения ферментативной активности необходимо выбрать буфер, который не тормозит исследуемую активность и обеспечивает поддержание pH раствора, близкой к оптимальной для данного фермента. Реакцию проводят при температуре, лежащей в большинстве случаев в пределах 25–40 °С. При исследовании ферментов, требующих присутствия кофакторов (ионов металлов, коферментов и др.), концентрация которых может снижаться по мере очистки фермента, в реакционную смесь следует добавлять недостающие кофакторы, например, соли металлов, АТФ, НАДФ и другие. Также для определения активности ферментов вводят стабилизаторы в состав опытных смесей. Во многих случаях добавление желатина, альбумина и других добавок предотвращает денатурацию ферментного белка.

### Методы определения активности ферментов

Отличительными особенностями ферментов как аналитов являются:

- содержание в клетках и биологических жидкостях в очень низком количестве;
- небольшое время их существования в биоматериалах (быстрая обновляемость, быстрое уменьшение их каталитической активности при нарушениях синтеза и элиминации);
- высокая каталитическая активность нативных ферментов в оптимальных условиях;
- нестабильность *in vitro*;
- высокая активность (и, следовательно, широкий диапазон содержания) при патологических состояниях;
- различная диагностическая специфичность различных ферментов внеклеточной жидкости.

В противоположность большинству других биохимических компонентов биологических жидкостей количество ферментов (в молях или мг) не может быть измерено, за небольшим исключением. Объясняется это тем, что количество молекул фермента в исследуемом материале крайне мало и существующими биохимическими методами такие количества измерить не удастся. О количестве фермента косвенно судят по его активности, то есть по производимому ферментом действию. Иными словами, присутствие и количество ферментов в исследуемом материале распознается по их специфичности и скорости катализируемой ими реакции.

Любое изменение конформации ферментов, наличие ингибиторов или отсутствие активаторов приводит к изменению их каталитической активности. Присутствие в биожидкостях факторов, воздействующих на конформацию ферментов, изменяет их активность. К таким факторам, в частности, относится низкая аналитическая концентрация ферментов во внеклеточном пространстве; разбавление концентрации внутриклеточных ферментов в большом объеме ВКЖ может приводить к необратимым денатурационным изменениям и частичной или полной потере каталитической активности.

*Активность фермента* можно определить либо по скорости накопления продуктов ферментативной реакции, либо по скорости убыли субстрата.

Рекомендуется активность ферментов по возможности определять по начальной скорости реакции. В это время еще имеется избыток субстрата, продуктов реакции образовалось еще мало и фермент не успел частично разрушиться. Желательно определение активности ферментов производить в таких условиях, когда количество превращенного (израсходованного) субстрата не превышает 20 % от исходного уровня.

При исследовании ферментов, требующих для своего каталитического действия присутствия кофакторов, а также ионов металлов, последние должны быть добавлены в инкубационную смесь.

Для определения активности ферментов можно применять колориметрические, спектрофотометрические, флуориметрические, кондуктометрические и другие физико-химические методы. В практике работы клинико-диагностических лабораторий для определения активности ферментов чаще используют фотометрические и спектрофотометрические методы.

В основе *фотометрических методов* лежит измерение при помощи колориметров, фотометров интенсивности окраски веществ, образующихся при взаимодействии субстрата или продукта реакции со специфическими реагентами, добавленными в пробу, как правило, после остановки ферментативной реакции.

*Спектрофотометрические методы* основаны на поглощении света определенных участков спектра субстратами или продуктами реакции. Спектры поглощения этих соединений могут иметь максимумы при определенной длине волны как в ультрафиолетовой, так и в видимой области.

Спектрофотометрические методы широко применяются для определения активности оксидоредуктаз, в частности, дегидрогеназ, которые действуют с участием

$\text{NAD}^+$  или  $\text{NADP}$ . Переход  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$  ( $\text{NADP}^+$  в  $\text{NADPH}$ ) сопровождается изменением поглощения длины волны 340 нм; окисленная форма кофактора не поглощает эту длину волны, а восстановленная поглощает. Определение активности ферментов, основанное на разнице спектров поглощения окисленной и восстановленной форм никотинамидадениндинуклеотидных коферментов, получило название оптического теста Отто Варбурга.

Методики, в основе которых лежит тест Варбурга, могут быть использованы для определения активности не только дегидрогеназ, но и других ферментов. В этих случаях в инкубационную смесь вносят вспомогательные субстраты, ферменты и коферменты, среди которых содержатся либо окисленные  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADP}^+$ ), либо восстановленные их формы ( $\text{NADH}$ ,  $\text{NADPH}$ ).

Рассмотрим некоторые абсорбционные методы определения активности ферментов.

Как отмечалось выше, *активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата*. Скорость ферментативной реакции можно определять по изменению концентрации субстрата или продукта в реакционной смеси.

## **2. Способы определения концентрации продукта реакции или субстрата**

1. *Прямое фотометрирование*. Этот способ используют, если субстрат или один из продуктов реакции можно определить фотометрически. Таким продуктом является, например, р-нитрофенол, поэтому этот подход используют при определении активности фосфатаз. Кислая и щелочная фосфатазы гидролизуют пара-нитрофенол-фосфат с образованием пара-нитрофенола, который в щелочной среде окрашивается в желтый цвет, интенсивность окраски измеряют при 405 нм.

2. *Окрашивание продукта или субстрата красителем*. Если продукт ферментативной реакции или субстрат не имеет окраски, их превращают в окрашенные производные. В методе Райтмана – Френкеля для определения активности трансаминаз продукт реакции пируват переводят в окрашенную форму взаимодействием с 2,4-динитрофенилгидразином.

3. *Тест Варбурга*. В некоторых методах измерения активности ферментов используются сопряженные ферментативные реакции с участием  $\text{NADH}$  или  $\text{NADPH}$ , которые имеют максимум поглощения при 340 нм, в то время как их окисленные формы ( $\text{NAD}^+$  или  $\text{NADP}^+$ ) не поглощают свет данной длины волны.

При определении активности фермента оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации продукта (субстрата) или кофермента соответственно, т.е. подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера. Таким образом, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, надо измерить изменение оптической плотности  $A$  в единицу времени (в минуту).



## Способы измерения скорости ферментативной реакции

Определение активности ферментов биологических материалов осуществляют при помощи нескольких способов определения скорости ферментативной реакции.

### 1. Измерение «по конечной точке».

Способ заключается в измерении оптической плотности на линейном участке кинетической кривой по истечении определенного четко фиксированного отрезка времени  $t$  от начала реакции. Такой способ называют ещё одноточечной кинетикой. Как правило, по истечении указанного отрезка времени  $t$  в реакционную смесь вносят реагент, останавливающий ферментативную реакцию, например, кислоту или щелочь. Отсюда и название способа – «по конечной точке».

Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле (1):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} = \frac{A_{\text{оп.}} - A_{\text{хол.}}}{t}, \quad (1)$$

где  $A_{\text{оп.}}$  – оптическая плотность опытной пробы на реагент или сыворотку;

$A_{\text{хол.}}$  – оптическая плотность холостой пробы на реагент или сыворотку, если они вносят значительный вклад в окраску реакционной смеси;

$t$  – время от начала реакции.

### 2. Измерение двухточечное.

При этом способе оптическую плотность определяют на линейном участке кинетической кривой дважды, четко фиксируя интервал времени  $t$  между измерениями. Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле (2):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} = \frac{A_2 - A_1}{t}, \quad (2)$$

где  $A_2$  – конечное значение оптической плотности в выбранном интервале времени;

$A_1$  – начальное значение оптической плотности в выбранном интервале времени;

$t$  – интервал времени.

Этот способ используют в современных методах определения активности многих ферментов.

### 3. Измерение многоточечное, или кинетическое.

При этом способе оптическую плотность на линейном участке кинетической кривой определяют 3–5 раз через четко фиксированные интервалы времени. Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле (3):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} = \frac{\Delta \bar{A}}{t}, \quad (3)$$

где  $\bar{A}$  – среднее значение оптической плотности в выбранном интервале времени;

$t$  – интервал времени.

Многоточечная кинетика используется только для биохимических анализаторов, так как в ручном варианте это достаточно трудоемко. Двух- и многоточечный варианты особенно эффективны при определении активности аллостерических ферментов. Многоточечная кинетика считается наиболее точным способом измерения скорости ферментативной реакции.

## Расчет ферментативной активности

Ферментативную активность рассчитывают по калибратору, калибровочной кривой и коэффициенту экстинкции продукта или субстрата.

1. *Расчет по калибратору* (стандарту) проводят при наличии в наборе реагентов раствора продукта реакции, или субстрата с известной концентрацией. При этом на всей области определения активности фермента оптическая плотность реакционной смеси должна линейно зависеть от концентрации калибратора, т.е. подчиняться закону Бугера – Ламберта – Бера.

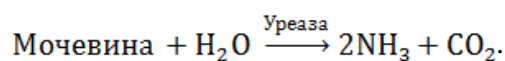
2. *Расчет по калибровочной кривой* проводят, если оптическая плотность реакционной смеси *нелинейно* зависит от концентрации продукта реакции. Это может происходить по ряду причин: поток световой энергии не является монохроматическим, что имеет место, когда используются интерференционные или стеклянные светофильтры, т.е. зависит от средства измерения оптической плотности; молекулы растворителя взаимодействуют с частицами вещества, поглощающими световую энергию. Это взаимодействие изменяется с изменением концентрации вещества; изменение pH раствора влияет на устойчивость образующихся соединений; прочее.

При нелинейной зависимости экстинкции реакционной смеси от концентрации продукта реакции в процессе анализа одновременно с опытными пробами инкубируют не менее четырех стандартных (калибровочных) проб, содержащих продукт в различных, но известных концентрациях. По полученным данным строят калибровочный график в координатах ( $X = E$ ), ( $Y = \Delta A/\text{мин}$ ), или ( $Y = \Delta A/\text{за время реакции}$ ,  $\Delta A = A_{\text{оп.}} - A_{\text{хол.}}$ ) и по нему находят активность в опытной пробе.

## Ферментные методы определения субстратов

В настоящее время ферментативными методами определяют глюкозу, креатинин, мочевины, мочевую кислоту, холестерин, триацилглицерины, лактат и многие другие анализы. В качестве примера приведем схемы реакций и принципы некоторых методов.

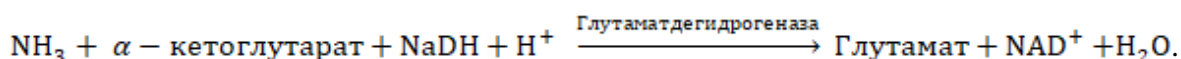
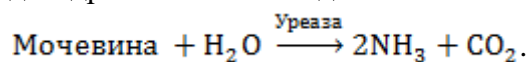
1. Уреазный салицилат-гипохлоритный, уреазный фенол-гипохлоритный метод определения мочевины:



$\text{NH}_3 + \text{салицилат натрия} + \text{гипохлорит натрия} + \text{нитропруссид натрия} \rightarrow$   
 $\rightarrow \text{продукт зеленого цвета.}$

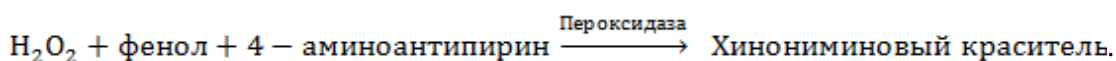
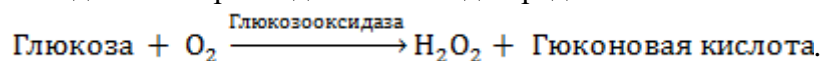
Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна концентрации мочевины. В фенолгипохлоритном методе место салицилата натрия (точнее, 4-хлорсалицилата натрия) используют фенол и получают продукт голубого цвета (фенолиндофеноловый синий).

2. Уреазный глутаматдегидрогеназный метод:



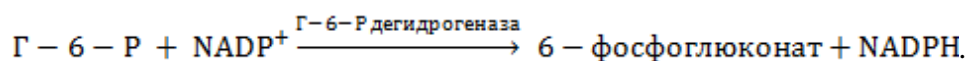
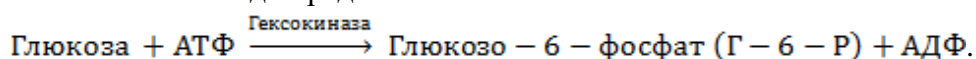
Скорость окисления NADH пропорциональна концентрации мочевины.

3. Глюкозооксидазный-пероксидазный метод определения глюкозы:



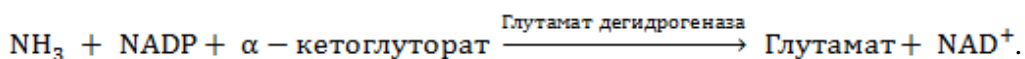
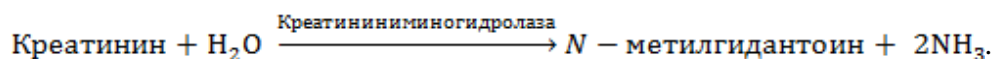
Концентрация продукта реакции пропорциональна концентрации глюкозы в пробе, так как скорость его образования пропорциональна концентрации образованного при окислении глюкозы пероксида водорода.

4. Гексокиназный метод определения глюкозы:



Количество образовавшегося в результате сопряженных реакций NADPH пропорционально концентрации глюкозы в пробе.

5. Креатининиминогидролазно-глутаматдегидрогеназный метод определения креатинина:



Скорость окисления NADH пропорциональна концентрации креатинина.

По способу фотометрирования эти методы разделяют на колориметрические и УФ-методы, когда фотометрирование осуществляют при 340 нм. По участку кинетической кривой, на котором происходит фотометрирование, различают кинетические методы и методы «по конечной точке».

В первом случае фотометрирование осуществляют на начальном линейном участке кинетической кривой, при этом скорость изменения оптической плотности реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита; во втором – когда кинетическая кривая выходит на плато, при этом оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита.

Таким образом, все используемые методы можно объединить в 4 группы:

- колориметрические по конечной точке,
- колориметрические кинетические,
- УФ-методы по конечной точке,
- кинетические УФ-методы.

Сущность колориметрических методов по конечной точке заключается в следующем:

1. На первом этапе аналит с помощью ферментативной реакции или цепи реакций превращают в продукт, который можно определить колориметрическим методом.

2. На втором этапе этот продукт взаимодействует с хромогенным комплексом, в результате образуется окрашенное соединение, которое фотометрируют; интенсивность его окраски пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости.

Расчет концентрации аналита проводят относительно концентрации калибратора (стандарта) по формуле (4):

$$C = \frac{A_{\text{оп.}} - A_{\text{хол.}}}{A_{\text{кал.}} - A_{\text{хол.}}} \cdot C_{\text{кал.}}, \quad (4)$$

где  $C$  – концентрация аналита;

$A_{\text{оп.}}$  – оптическая плотность опытной пробы;

$A_{\text{хол.}}$  – оптическая плотность холостой пробы (бланка);

$A_{\text{кал.}}$  – оптическая плотность калибратора;

$C_{\text{кал.}}$  – концентрация аналита калибратора.

Необходимо отметить, что все реакции как первого, так и второго этапов должны во время инкубации обеспечить полное превращение субстратов в продукты, т.е. кинетика всех реакций должна выходить на плато (доходить до конца), отсюда название «по конечной точке».

Чтобы все реакции проходили до конца, необходимо очень аккуратно и точно соблюдать условия инкубации, указанные в инструкциях к используемому набору реагентов (рН, температуру, время реакции и т.д.).

### Колориметрические кинетические методы

К этой группе можно отнести методы, аналогичные методам по конечной точке, только фотометрирование в этом случае проводят на линейном участке кинетической кривой. Скорость изменения оптической плотности реакционной смеси (скорость ферментативной реакции) прямо пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два (двухточечная кинетика) или несколько (многоточечная кинетика) измерений оптической плотности через четко фиксированные интервалы времени. Изменения оптической плотности рассчитывают по формуле (5) (для двухточечной кинетики):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} = \frac{A_m - A_n}{t}, \quad (5)$$

где  $A_m$  – значение оптической плотности в точке  $m$  в выбранном интервале времени;

$A_n$  – значение оптической плотности в точке  $n$  в выбранном интервале времени;

$t$  – интервал времени для выбранных точек.

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора. Все измерения оптической плотности должны производиться точно на линейном участке кинетической кривой.

## УФ-методы по конечной точке

Примером применения такого метода измерения является определение глюкозы в крови гексокиназным методом. Его сущность заключается в том, что на последнем этапе цепи ферментативных превращений глюкозы участвует глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, при действии которой  $\text{NADP}^+$  восстанавливается в  $\text{NADPH}$ . Концентрацию  $\text{NADPH}$  определяют фотометрически при длине волны 340 нм (УФ метод). Она пропорциональна концентрации в крови глюкозы. Расчет проводят относительно калибровочного раствора глюкозы. В этом методе все ферментативные реакции должны обеспечить полное превращение субстратов в продукты и  $\text{NADP}^+$  в  $\text{NADPH}$ , т.е. кинетические кривые должны выйти на плато за время инкубации.

## Основные правила работы с ферментами

Работа с ферментами требует соблюдения простых правил, вытекающих из общих для всех ферментов свойств:

1. Нельзя сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образования пены при их перемешивании, так как ферменты при этом могут инактивироваться в результате воздействия на них кислорода воздуха.

2. Растворенные, лиофильно высушенные реагенты, контрольные материалы и контрольные сыворотки, содержащие ферменты, перед использованием следует выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции, чтобы фермент приобрел конформационно активное состояние.

Необходимо строго соблюдать условия ферментативной реакции, указанные в инструкции: время и температуру инкубации, соотношение реагент/сыворотка.

3. Время начала и окончания ферментативной реакции следует фиксировать по секундомеру, причем в случае определения активности ферментов и кинетических методов определения аналитов для каждой отдельной пробы, а не для серии целиком, иначе результаты анализа будут неверными. Началом реакции считается момент добавления сыворотки (или стартера) в реакционную смесь, а также окрашивающего реагента, если реакция двухстадийная.

4. Перед началом ферментативной реакции температуру рабочего реагента необходимо довести до значения, указанного в инструкции, и обеспечивать его поддержание в течение всего времени анализа с точностью  $\pm 0,1$  °C. В случае ферментативных методов анализа желательнее, а при определении активности ферментов обязательно, использовать водяную баню (водяной термостат). Так как теплопроводность воды значительно выше теплопроводности воздуха, водяной термостат быстрее и надежнее обеспечивает установку и поддержание заданной температуры реакционной смеси.

5. Нельзя изменять соотношение рабочий реагент/сыворотка. Его уменьшение в целях экономии может привести к сужению линейной области определения в случае определения активности фермента и к неполному превращению аналита в случае ферментативных методов анализа, т.е. к получению заниженных результатов. При увеличении соотношения рабочий реагент/сыворотка снижается чувствительность метода.

6. Также нельзя разбавлять рабочий реагент в целях экономии, так как при этом условия реакции (концентрация буфера, активаторов и т.д.) отклоняется от оптимальных, что приведет к занижению результатов анализа как в случае определения активности ферментов, так и в случае определения аналитов ферментативными методами.

7. Если концентрация фермента или другого аналита превышает верхнюю границу линейности набора, то исследуемую пробу необходимо разбавить строго в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструкции к набору (чем разбавлять во сколько раз). Несоблюдение указаний может привести к серьезным ошибкам, т.к. в сыворотке присутствует огромное количество соединений, тем или иным образом влияющих на аналит и результат его определения (особенно это касается ферментов). Для получения точных и воспроизводимых результатов пробу вообще лучше не разбавлять, тем более что активность некоторых ферментов (например, АЛТ и АсАТ) непропорционально уменьшается при разбавлении. В необходимых случаях надо стремиться разбавлять пробу минимально, желательно в 2–3 раза (особенно при определении активности ферментов) и не больше, чем указано в инструкции. Для разведения нельзя использовать маленькие аликвоты (10–20 мкл); чтобы уменьшить ошибку разведения, лучше взять хотя бы 100 мкл пробы.

8. Фотометрирование следует проводить в указанном в инструкции диапазоне длин волн, отклонение может существенно снизить чувствительность метода. В случае расчета концентрации аналита или активности фермента по коэффициенту экстинкции длина волны должна точно соответствовать указанной в инструкции. Так как коэффициент экстинкции – это оптическая плотность раствора вещества с концентрацией 1 мкмоль/л в кювете с длиной оптического пути в 1 см при данной длине волны, то для другой длины волны значение его будет иным и может значительно отличаться.

9. Длина оптического пути кюветы для фотометрирования должна соответствовать указанной в инструкции. Использование кюветы с меньшей длиной оптического пути снизит чувствительность метода.

10. Калибровочную пробу необходимо ставить для каждой серии анализов в 4-х параллелях.

11. Следует тщательно мыть посуду, пипетки, наконечники и многократно ополаскивать их дистиллированной водой. Для мытья посуды нельзя использовать моющие средства, содержащие биодобавки; содержащиеся в них протеазы даже в следовых количествах могут разрушать ферменты в реакционной среде. Особенно тщательно нужно отмывать перекись водорода, используемую для обеззараживания пробирок и наконечников.

12. Необходимо следить за качеством дистиллированной воды, используемой в процессе анализа. Избыток некоторых ионов, входящих в ее состав, может ингибировать ферменты.

13. При работе с ферментными наборами реагентов желательнее, а при дозировании малых объемов проб, реагентов (10–30 мкл) обязательно следует пользоваться поверенными автоматическими микродозаторами. Наконечники для них повторно лучше не использовать, особенно те, которыми проводили отбор сыворотки и затем обеззараживали перекисью водорода.

14. Для получения достоверных результатов очень важен преаналитический этап. Рекомендуются как можно быстрее отделять сыворотку от сгустка (гемолиз, например, завышает результаты определения ЛДГ, АлАТ). Хранение сыворотки также неблагоприятно сказывается на результатах определения активности многих ферментов (они, обычно, занижаются), поэтому следует измерять активность ферментов в сыворотке в день взятия крови у пациента.

Соблюдение этих и некоторых других правил работы гарантирует высокую точность и воспроизводимость результатов анализа [14].

### **3. Лабораторные работы по разделу 1**

#### **Лабораторная работа 1 Получение ферментного препарата и определение глюкоамилазной активности**

*Цель* – определение активности глюкоамилазы и содержания глюкозы ферментативным методом.

*Материалы и оборудование:* фотоэлектроколориметр, водяная баня, термостат, рН-метр, секундомер, технические весы, аналитические весы; фарфоровая чашка со ступкой, пробирки, пипетки, мерные колбы.

*Реактивы:* дрожжи; фосфатный буфер рН 7,5; фосфатный буфер рН 5,6; насыщенная бензойная кислота; 0,1 % раствор глюкозы в бензойной кислоте; крахмал; раствор 1; раствор 2; раствор 3; глюкоза; кварцевый песок или толченое стекло, ферменты глюкозооксидаза, пероксидаза.

#### *Приготовление растворов*

Во всех работах здесь и далее для приготовления раствора и проведения анализа используют дистиллированную воду, кроме случаев, оговоренных специально.

1. Фосфатный буфер рН 7,5: смешивают равные объемы  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (136 г безводного  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в 1 л воды) и КОН (56 г КОН в 1 л воды)).

2. Фосфатный буфер рН 5,6: смешивают 5 мл  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (11,876 г в 1 л воды) и 99,5 мл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (9,078 г в 1 л воды).

3. Насыщенная бензойная кислота: растворить 2,7 г бензойной кислоты в воде в мерной колбе на 1 л.

4. Раствор 1: 0,1 г гексациано(II)-феррата калия (железосинеродистого калия) растворяют в 100 мл воды.

5. Раствор 2: 5,6 г фермента глюкооксидазы (соответствующие 500–600 Е/г ферментативной активности при активности глюкооксидазы 10000 Е/г) растворяют в 1 М фосфатном буфере рН 7,5 в мерной колбе на 50 мл, затем добавляют 2 мг пероксидазы, объем доводят до метки 1 М фосфатным буфером, полученный раствор хранят в темной склянке в холодильнике в течение 2–3 суток.

6. Раствор 3 (смешивают равные объемы растворов 1 и 2).

#### *Сущность метода*

Ферментативный метод определения количества вещества из-за высокой специфичности один из самых точных. В частности, его применяют для определения глюкоамилазной активности там, где используется комплекс двух ферментов: глюкооксидазы и пероксидазы. Метод основан на количественном определении глюкозы, образующейся при гидролизе растворимого крахмала ферментом глюкоамилазой ( $\alpha$ -1,4-гликанглюкогидролаза, КФ.3.2.1.3). Фермент в литературе известен под различными названиями: амило-гликозидаза, матулаза и т.д. Отличительной особенностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимерный субстрат, чем олиго- и дисахариды. Глюкоамилазная активность характеризует способность ферментного препарата катализировать расщепление растворимого крахмала до глюкозы и выражается числом единиц стандартной активности в 1 г препарата. За единицу глюкоамилазной активности принято такое количество фермента, которое гидролизует растворимый крахмал при температуре 30 °С и рН 4,7 и в течение 1 мин освобождает 1 ммоль глюкозы.

Для определения активности в работе используют два фермента – глюкооксидазу и пероксидазу. Первый катализирует окисление освобожденной глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты. Вторым продуктом реакции является пероксид водорода, который при участии фермента пероксидазы окисляет железосинеродистый калий до ферроцианата калия, окрашенного в желто-лимонный цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству образующейся глюкозы.

#### *Ход работы*

5 г пекарских дрожжей тщательно растирают с кварцевым песком или толченым стеклом с 20 мл забуференной воды (10 %-й буферный раствор) в течение 10–15 мин, выливают в ступку оставшуюся забуференную воду, перемешивают и оставляют эту смесь на 30 мин в термостате при температуре 30 °С для наиболее полного извлечения ферментов из культуры. После настаивания смесь отфильтровывают через складчатый фильтр и фильтрат используют как исходный раствор для определения ферментативной активности.

Для определения ферментативной активности из исходного раствора готовят разведение: 1 мл исходного фермента доводят водой до 50 мл (разведение в 50 раз) и до 100 мл (разведение в 100 раз). 5 мл исследуемого разведенного ферментного раствора, нагретого до 30 °С, приливают к 10 мл 1 %-го раствора крахмала в соответствующем буферном растворе, нагретого до этой же температуры, и инкубируют 10 мин в



термостате при 30 °С. Потом отбирают 1 мл гидролизата, переносят в маленькую пробирку, помещенную в кипящую водяную баню, инактивируют фермент в течение 2 мин и затем охлаждают водой. Для определения содержания глюкозы в пробирку с охлажденным гидролизатом вносят 3 мл раствора 3, перемешивают и оставляют на 45 мин при комнатной температуре.

Одновременно с исследуемой пробой готовят контрольную пробу. Для этого 5 мл ферментного раствора кипятят на водяной бане 10 мин (для инактивации фермента), затем раствор охлаждают и добавляют 10 мл 1 %-го раствора крахмала. Все последующие операции с контрольными пробами проводят так же, как и с опытными.

Кроме контрольной пробы на инактивированный фермент ставят контрольную пробу на рабочий раствор 3. Для этого к 3 мл рабочего раствора приливают 1 мл воды.

Интенсивность окраски полученных растворов измеряют на фотоэлектродетекторе при длине волны 380 нм и в кювете с толщиной слоя 10 мм. Если контрольные пробы на инактивированный фермент имеют заметную окраску, исследуемый раствор колориметрируют, используя для сравнения рабочий раствор. Величина оптической плотности должна лежать в рабочей градуировочной кривой, т.е. в пределах оптической плотности, соответствующей количеству глюкозы от 10 мкг до 150 мкг. Если при измерении интенсивности окраски исследуемой пробы полученные значения не укладываются в градуировочную кривую, опыт повторяют с меньшим количеством раствора.

*Обработка результатов.* По полученным значениям экстинции исследуемой пробы находят количество глюкозы, образовавшейся в результате действия фермента.

Глюкоамилазную активность (в Е/г или Е/мл) определяют по формуле (6):

$$\text{ГлА} = a \cdot (V \cdot 180 \cdot 10), \quad (6)$$

где ГлА – глюкоамилазная активность, Е/г или Е/мл;

*a* – количество глюкозы, образовавшейся в 1 мл гидролизата за счет действия фермента, мкг;

*V* – количество фермента в 1 мл гидролизата, г (или мл);

180 – молекулярная масса глюкозы (пересчет мкг в мкмоль);

10 – время гидролиза, мин.

*Пример.* 1 мл исходного ферментного раствора доводят до 100 мл водой. На определение берут 5 мл полученного раствора, объем реакционной смеси – 15 мл. Устанавливают количество фермента в миллилитрах:

$$\frac{0,01 \cdot 5}{15} = 0,003 \text{ мл.}$$

В результате измерения на фотоэлектродетекторе этого раствора получена величина  $A = 0,347$ . По градуировочной кривой она соответствует 170 мкг глюкозы. Подставив ее в формулу (6), определяют значение глюкоамилазной активности в единицах на миллилитр:

$$\text{ГлА} = 170 \cdot (0,003 \cdot 180 \cdot 10) = 918 \text{ Е/мл.}$$

При построении градуировочной кривой для определения количества глюкозы используют стандартные растворы глюкозы с концентрацией 50, 100, 150 мкг/мл. Для этого готовят исходный раствор (50 мг глюкозы разводят в 100 мл воды в мерной колбе), а затем – стандартные растворы согласно табл. 1.

Таблица 1 – Количественные характеристики стандартных растворов

Номер	Объем исходного раствора, мл	Объем дистиллированной воды, мл	Конечная концентрация глюкозы, мкг/мл
1	10	90	50
2	20	80	100
3	30	70	150

К 1 мл стандартного раствора глюкозы добавляют 3 мл рабочего раствора. В качестве контроля используют 1 мл воды с 3 мл рабочего раствора. Содержимое пробирок перемешивают и через 45 мин измеряют оптическую плотность стандартных растворов относительно контрольной на фотоэлектроколориметре при длине волны 380 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. По полученным значениям строят градуировочную кривую, откладывая по оси абсцисс количество глюкозы, а по оси ординат – оптическую плотность.

## **Лабораторная работа 2**

### **Определение активности липазы по модифицированному методу Ота – Ямада**

*Цель* – определение активности липазы.

*Материалы и оборудование:* фотоэлектроколориметр, водяная баня, магнитная мешалка с подогревом, термостат, секундомер, технические весы, аналитические весы; цилиндры, кристаллизатор, плоскодонная колба, стаканы, пипетки, мерные колбы с пробками, бюретка, штатив с лапками.

*Реактивы:* оливковое масло; 2 %-й раствор поливинилового спирта; 1 Н раствор HCl; 0,05 Н раствор NaOH; фосфатно-цитратный буфер с pH = 7,0; 1 %-й раствор фенолфталеина; 90 %-й раствор этилового спирта; 1 %-й раствор фермента.

*Приготовление растворов*

1. Субстрат: 100 мл оливкового масла смешивают со 150 мл 2 %-го раствора поливинилового спирта в пищевом гомогенизаторе в течение 5–10 мин. Полученную эмульсию выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивание не наблюдается, субстрат пригоден к использованию. Если замечено расслаивание, перемешивание необходимо повторить.

2. Ферментный раствор: 200 мг испытуемого образца растворяют в 200 мл дистиллированной воды.

### *Сущность метода*

Метод основан на определении путем титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла.

За единицу ферментной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40 %-й эмульсии оливкового масла при  $pH = 7,0$  и температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение часа.

### *Ход определения*

5 мл эмульсии субстрата и 4 мл буфера с  $pH = 7,0$  помещают в плоскодонную колбу на  $100\text{ см}^3$ , которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 1 мл раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин, после чего немедленно добавляют 30 мл этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05 Н раствором NaOH в присутствии 1 %-го раствора фенолфталеина до исчезновения окраски. Контрольную пробу готовят следующим образом: к смеси субстрата и буфера с  $pH = 7,0$ , выдержанной при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , добавляют 30 мл этанола, затем 1 мл ферментного раствора и смесь немедленно титруют. Разность между результатами титрований контрольной и опытной проб соответствует количеству 0,05 Н раствора NaOH, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся из оливкового масла под действием фермента.

### *Обработка результатов*

Липазную активность ферментного препарата ЛС (ед/г) определяют по формуле (7):

$$ЛС = \frac{А \cdot Т \cdot 50}{В}, \quad (7)$$

где А – разность между результатами титрования опытной и контрольной пробы,  $\text{см}^3$ ;

Т – титр щелочи;

В – концентрация образца ферментного раствора,  $\text{г}/\text{см}^3$ ;

50 – коэффициент пересчета в мкмоль жирных кислот.

## **Лабораторная работа 3**

### **Определение амилолитической активности (АС)**

Колориметрический метод по ГОСТ 20264.4-740

*Цель* – определение активности амилолитических ферментов.

*Материалы и оборудование:* фотоэлектроколориметр, водяная баня, термостат, секундомер, технические весы, аналитические весы; шпатели, колбы конические, пробирки, пипетки, мерные колбы с пробками.

*Реактивы:* раствор крахмала 1 %; основной раствор йода; рабочий раствор йода.

### *Приготовление растворов*

1. Основной раствор йода: 0,5 г металлического йода и 5 г йодида калия помещают в бюкс, добавляют 2 мл дистиллированной воды и закрывают притертой крышкой. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу на 200 мл с пришлифованной пробкой, и объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой при 20 °С. Основной раствор хранят в темноте и используют в течение месяца.

2. Рабочий раствор йода. 2 мл основного раствора разводят 0,1 Н раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 мл. Перед употреблением проверяют его оптическую плотность на КФК, применяя кюветы с рабочей длиной 10 мм и светофильтр с максимумом пропускания при  $\lambda = 453$  нм (синий).

### *Сущность метода*

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы. Амилолитическая активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в одном грамме препарата. За единицу активности амилолитических ферментов принято такое число, которое в строго определенных условиях температуры, рН и времени действия катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала, или 30 % от введенного в реакцию вещества.

*Ход определения:* в две пробирки диаметром 2 см и высотой 18 см наливают по 10 мл 1 %-го раствора крахмала и ставят их в термостат или в водяную баню с температурой 30 °С на 5–10 мин. Затем, не вынимая пробирок из термостата, наливают в первую пробирку 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды (контрольная), во вторую 5 мл ферментного раствора (опытная). Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате 10 мин (по секундомеру). Затем из реакционных смесей (контрольного и опытного растворов) отбирают по 0,1 мл раствора и переносят их в колбы, с 10 мл рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный – синюю, опытный – фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала. Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при  $\lambda = 656$  нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода. Оптическая плотность контрольного раствора Д<sub>1</sub> соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора Д<sub>2</sub> соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата.

### Обработка результатов

Количество гидролизованного крахмала  $c$  (в г) определяют по формуле (8):

$$c = \frac{0,1 \cdot (D_1 - D_2)}{D_1}, \quad (8)$$

где 0,1 – количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

$D_1$  – оптическая плотность контрольного раствора;

$D_2$  – оптическая плотность опытного раствора.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 г или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления. Если в результате ферментативной реакции количество превращенного крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчета амилолитической активности.

Амилолитическую активность АС (ед/мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле (9), а амилолитическую активность препаратов грибного происхождения – по формуле (10):

$$AC = \frac{(5,885 \cdot c + 0,001671) \cdot 1000}{n}, \quad (9)$$

$$AC_1 = (7,264 \cdot c - 0,03766) \cdot 100, \quad (10)$$

где 5,885 и 0,001671 – коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 час действия фермента);

$c$  – количество прогидролизованного крахмала, г;

1000 – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

$n$  – количество (пересчета) ферментного препарата, взятое для испытания, мг.

Влажность используемого крахмала определяется методом высушивания до постоянной массы. Этот метод является более точными может быть использован для определения влажности любого объекта. В предварительно высушенный и доведенный до постоянной массы бюкс отвешивают 1–2 г исследуемого вещества с точностью до 0,0001 г. Бюкс помещают на 2 часа в сушильный шкаф с температурой 60–80 °С, затем температуру повышают до 105 °С. В процессе высушивания бюкс периодически взвешивают. Первый раз через 4 часа, затем через каждый час. Перед каждым взвешиванием бюкс охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе. Образец считается высушенным до постоянного веса, когда разность между двумя последними взвешиваниями не превышает 0,001 г.

Влажность  $w$  (%) рассчитывается по формуле (11):

$$w = \frac{a - b}{a} \cdot 100, \quad (11)$$

где  $a$  – масса навески перед сушкой, г;

$b$  – масса навески после сушки, г.

## Лабораторная работа 4

### Количественное определение протеолитической активности желудочного сока по Ансону [10]

*Цель* – определение протеолитической активности ферментов.

*Материалы и оборудование:* центрифуга, фотоэлектроколориметр, термостат, секундомер, технические весы, аналитические весы; цилиндры, центрифужные пробирки, пробирки, пипетки, мерные колбы.

*Реактивы:* желудочный сок; 5 %-й раствор казеината натрия; 5 %-й раствор ТХУ; раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; реактив Фолина.

*Принцип метода.* О протеолитической активности желудочного сока судят по количеству образующихся при расщеплении казеина не осаждаемых трихлоруксусной кислотой пептидов, количество которых соответствует количеству определяемого в них тирозина.

#### *Ход работы*

В две центрифужные пробирки отмерить по 1 мл желудочного сока, разведенного в 10 раз. В опытную пробирку добавить 1,0 мл 5 %-го раствора казеината натрия, а в контрольную – 2,0 мл 5 %-го ТХУ. Содержимое пробирок перемешать, поместить в термостат при температуре 38 °С на 20 мин. После термостатирования в контрольную пробу добавить 1 мл 5 %-го раствора казеината натрия, в опытную – 2,0 мл 5 %-го ТХУ. Выдержать 15 мин. Далее центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. После этого отобрать в 2 пробирки по 1 мл центрифугата (надосадочной жидкости) и по 5 мл 0,5 Н раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . При перемешивании в обе пробирки добавить по 1 мл реактива Фолина и выдержать 20 мин. Оптическую плотность опытного раствора измерить на КФК при длине волны 760 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной 10 мм против контроля.

#### *Обработка результатов*

Концентрацию тирозина ( $C_{\text{тир.}}$ ) найти по калибровочному графику.

$$A = 2C_{\text{тир.}} \text{ (мкмоль/мл·мин)}$$

В норме протеолитическая активность желудочного сока равна 0,15–0,5 мкмоль/мл·мин [4].

## 4. Контрольные вопросы

1. В каких единицах измеряется активность ферментов?
2. Чем отличается глюкоамилаза от других амилаз?
3. На чем основан метод определения глюкоамилазной активности?
4. Опишите особенности химической структуры крахмала.
5. На чем основан метод определения активности липазы?
6. Опишите особенности химической структуры липидов.
7. На чем основан метод определения активности протеаз (по методу Ансона)?
8. Опишите особенности химической структуры белков.

## 5. Задания для самопроверки

1. Ретроингибирование конечным продуктом при биосинтезе биологически активных веществ – это:

- а) подавление последнего фермента в метаболической цепи,
- б) подавление начального фермента в метаболической цепи,
- в) подавление всех ферментов в метаболической цепи.

2. Термин *мультиферментный комплекс* означает:

а) комплекс ферментных белков, выделяемый из клетки путем экстракции и осаждения;

б) комплекс ферментов клеточной мембраны;

в) комплекс ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита;

г) комплекс экзо- и эндопротеаз.

3. Фермент, применяемый для получения безлактозного молока:

а) глюкозоизомераза,

б) аминоксилаза,

в) пенициллинамидаза,

г)  $\beta$ -галактозидаза,

д) простагландинэндопероксидсинтетаза.

4. Важнейшая группа антибиотиков, образуемых плесневыми грибами и объединенных под общим названием « $\beta$ -лактамы» (пенициллины и цефалоспорины), достаточно широко представлена на фармацевтическом рынке. Проведите анализ  $\beta$ -лактамов антибиотиков с точки зрения:

– продуцентов, химической структуры и биологической активности;

– биологической роли антибиотиков для продуцентов и механизмов защиты продуцентов от антибиотиков;

– механизма биосинтеза и механизма действия на бактериальную клетку.

5. На основании классификации биосинтеза по материальным потокам проведите сравнительную характеристику режимов ферментации в зависимости от целевого продукта биотехнологического производства.

6. Получение субстанции аскорбиновой кислоты является многостадийным процессом, в котором сочетаются методы органического и микробиологического синтеза. Какой предшественник аскорбиновой кислоты получают с использованием биотехнологии и каково значение этого этапа для всего процесса в целом? Приведите схему процесса.

7. Проанализируйте возможность успешного сочетания биосинтеза, оргсинтеза и биотрансформации на примере получения бета-лактамов антибиотиков.

8. Для оценки эффективности использования отдельных видов микроорганизмов для продуцирования белковой массы можно использовать показатель скорости роста. Скорость роста  $V$  (г/ч) характеризует прирост биомассы за единицу времени и рассчитывается по формуле  $V = \frac{\Delta X}{\Delta t}$ . Определите скорость роста биомассы (г/л·ч) на выделенном участке кривой (рис. 1). Найдите время, через которое объем биомассы утроится, если начальное значение составляло 0,0058 г/л (найденную скорость роста биомассы считать постоянной до окончания ферментации).

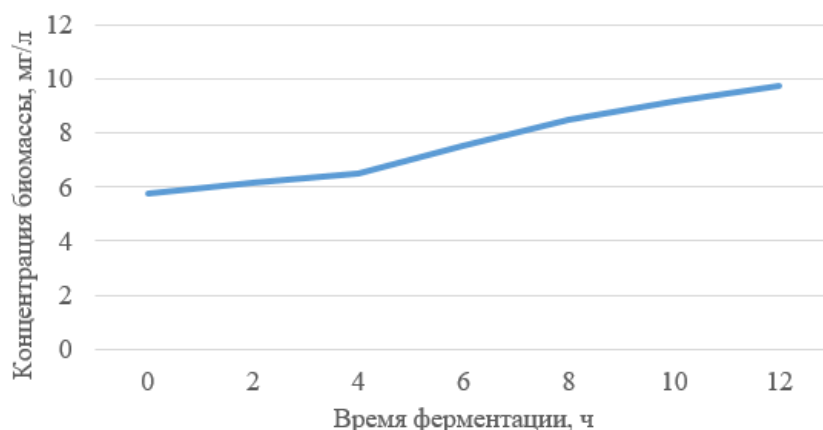


Рисунок 1 – Показатели роста биомассы

9. Известно, что витамин D преимущественно получают в результате биосинтеза эргостерола (предшественника витамина D) микроорганизмами. Наиболее активные продуценты эргостерола – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*. В промышленных масштабах эргостерол получают при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах с избытком сахаров при дефиците азота, высокой температуре и хорошей аэрации.

В среднем дрожжи способны синтезировать 6–7 % эргостерола (к общей биомассе дрожжей), некоторые виды мицелиальных грибов – до 10 %. При этом важно оценивать экономическую целесообразность процесса биосинтеза, которая характеризуется коэффициентом эффективности биосинтеза (КЭБ) (12):

$$\text{КЭБ} = \frac{DB}{DS}, \quad (12)$$

где  $DB$  – прирост сухой биомассы продуцентов, г;

$DS$  – убыль сахаров в питательной среде, г.

Используя представленные ниже данные (табл. 2), определите среди предложенных микроорганизмов наиболее эффективный продуцент эргостерола. Рассчитайте выход эргостерола для каждого из продуцентов на конец культивирования при условии накопления эргостерола в количестве 6 % от сухой биомассы дрожжей.



Таблица 2 – Результаты определения биомассы микроорганизмов и массы сахаров в питательной среде в процессе биосинтеза эргостерола

Продуцент	Масса продуцента, г		Влажность биомассы микроорганизмов, %	Масса сахаров в питательной среде, г	
	на начало культивирования	на конец культивирования		на начало культивирования	на конец культивирования
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	4,3	65	6	4,1
<i>Saccharomyces uvarum</i>	1	2,8	72	6	4,6
<i>Candida quilliermondii</i>	1	3,1	70	6	4,3

10. Для оценки эффективности использования отдельных видов микроорганизмов для продуцирования белковой массы можно использовать показатель скорости роста. Скорость роста  $V$  (г/ч) характеризует прирост биомассы за единицу времени и рассчитывается по формуле  $V = \frac{\Delta x}{\Delta t}$ .

По данным таблицы 3 определите, какой вид бактерий обладает наибольшей скоростью роста в указанный промежуток времени.

Таблица 3 – Результаты определения биомассы микроорганизмов во время ферментации

Вид бактерий	Концентрация биомассы, г		Время ферментации, ч	
	начальное	конечное	начальное	конечное
<i>Methanomonas carbonatophila</i>	0,2	0,8	8	48
<i>Methanomonas methanooxidans</i>	0,1	0,9	12	52
<i>Pseudomonas propanica</i>	0,3	1,1	6	40
<i>Pseudomonas methanica</i>	0,2	0,9	10	46

11. Предприятие «N» организует выпуск хлеба, обогащенного витамином B<sub>6</sub>. Произведите расчет необходимого количества витамина B<sub>6</sub> в рецептуре хлебобулочного изделия (на 100 кг муки). При решении задачи необходимо учесть:

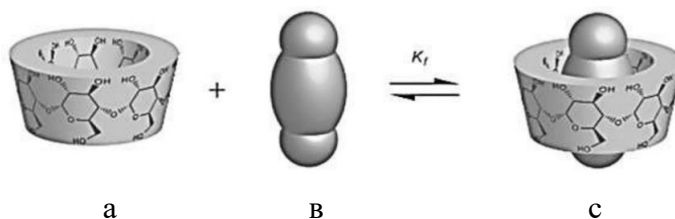
- рекомендуемая норма потребления витамина B<sub>6</sub> составляет 25 мг/сут на человека;
- поступление витамина B<sub>6</sub> в составе хлеба должно составлять 30 % от рекомендуемой нормы потребления;
- рекомендуемая норма потребления хлеба – 175 г/сут на человека;
- потери витамина B<sub>6</sub> в процессе технологии производства, при брожении теста и выпечке хлеба составят 40 %;
- выход хлеба составляет 140 % (т.е. из 100 г муки получаем 140 г готового продукта).

12. 5 мг фермента лактатдегидрогеназы за 30 мин катализирует превращение пирувата с образованием 20 мкмоль лактата. Рассчитайте активность фермента. Что произойдет, если в среде уменьшить количество НАД?

13. 1 мг фермента сукцинатдегидрогеназы за 5 мин катализирует окисление янтарной кислоты с образованием 10 мкмоль фумаровой кислоты. Рассчитайте удельную активность фермента. Что произойдет, если в среду добавить малоновую кислоту? Объясните последствия добавления малоновой кислоты.



14. В настоящее время для производства пищевых продуктов лечебно-профилактического назначения используют технологию обогащения биологически активными веществами (БАВ) в инкапсулированном (защищенном) виде (рис. 2). Для инкапсуляции, например, используют  $\beta$ -циклодекстрин (молярная масса: 1134,987 г/моль).



а –  $\beta$ -циклодекстрин, в – БАВ, с – комплекс инкапсулированного БАВ.

Рисунок 2 – Схематичное изображение инкапсуляции БАВ в  $\beta$ -циклодекстрин

Предприятие «N» решило производить биологически активную добавку (БАД) – рутин ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ), инкапсулированный в  $\beta$ -циклодекстрин. Рассчитайте, какое количество БАВ и  $\beta$ -циклодекстрина в граммах необходимо использовать для получения 100 г БАД, если для эффективной инкапсуляции необходимо обеспечить молярное соотношение 3 : 1 (БАВ :  $\beta$ -циклодекстрин). При этом инкапсулируется только 75 % БАВ, внесенного в исходную смесь.

15. Рассчитайте суточную потребность фермы в 500 голов коров в белковой биомассе, если потребность в сыром протеине с поступающим кормом одной коровы составляет 1,5 кг/сут. Доля сырого протеина из белковой биомассы в рационе должна составлять 20 %. При этом доля сырого протеина в белковой биомассе, получаемой на метане, составляет 75 %.

16. Определите, какое количество бактериальной биомассы из природного газа (г) с содержанием сырого протеина 74 % необходимо добавить в рацион коровы, если потребность в белке составляет 800 г/сут., а основной рацион включает компоненты, представленные в таблице 4.

Таблица 4 – Компоненты рациона коров

Компонент рациона	Содержание сырого протеина, г/1 кг	Содержание компонента в кормосмеси, кг
Зерно овса	77	4,0
Сено луговое	50	6,5
Кормовая свекла	3	12,0

17. Последние данные о количестве продовольствия и выработке продуктов сельского хозяйства показывают, что существует проблема обеспечения человечества продуктами питания. Численность населения планеты составляет 7,5 миллиарда человек. Около половины населения не обеспечивается должным количеством пищи, голодают примерно 500 миллионов человек,  $\frac{1}{4}$  людей Земли питается недостаточно. На эту проблему обратили внимание ученые, занимающиеся биотехнологией пищевой промышленности. Необходимо увеличить количество производимых белковых продуктов.

Источником протеина могут быть морские водоросли, белок составляет примерно 70 % от их собственного сухого веса. Подобные микроорганизмы способны синтезировать белок в 100 раз быстрее, нежели это делают животные. Корова весом около 300 кг способна в сутки вырабатывать 300 г чистого белка, в то время как 300 кг бактерий за это же время, синтезируют примерно 30 тысяч тонн протеиновых продуктов. Получение такого белка выгодно и менее трудоемко. Рассчитайте, какое количество водорослей, микроорганизмов, коров (каким весом) необходимо для синтеза 1 т белка за сутки? Какие условия необходимы для производства белка в каждом случае?

18. Для экспрессии клонированных эукариотических генов интенсивно используют клетки *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae*. Приведите краткую характеристику данных биологических объектов.

19. Главным критерием при отборе продуцентов является способность микроорганизмов синтезировать целевой продукт. Биотехнологическая промышленность предъявляет к продуцентам ряд требований. Опишите требования к продуцентам.

20. В основу подразделения биотехнологических процессов могут быть положены различные принципы, например функциональная активность биообъекта, возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства и т.д. Приведите обобщенную схему процессов в биотехнологии с учетом всех их видов и разновидностей.

21. Процесс приготовления питательных сред, всегда очень ответственен, так как от качества питательной среды во многом зависит результат проведения ферментации. Опишите принципиальную схему процесса приготовления питательной среды.

22. Технология получения биомассы на основе культуры клеток приобретает большое значение для производства лекарственных средств. Укажите преимущества использования технологий получения биомассы лекарственных растений в виде каллусных и суспензионных культур.

## **Раздел 2. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК В БИОТЕХНОЛОГИИ**

### **1. Иммуобилизация ферментов**

#### **Преимущества иммуобилизованных ферментов**

Ферменты и ферментативные системы традиционно применяются в самых различных областях практической деятельности: в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной и других отраслях промышленности, в медицине, сельском хозяйстве, органическом синтезе, химическом анализе. Тем не менее развитие прикладной энзимологии долгое время сдерживалось дороговизной или полным отсутствием на мировом рынке нужных ферментов, особенно их чистых препаратов. Благодаря успехам микробиологии был решен вопрос производства соответствующих ферментов в достаточном количестве. Применение ферментов было осложнено также, по крайней мере, двумя причинами. Во-первых, ферменты – вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Во-вторых, многократное использование ферментов затруднено из-за сложности их отделения от реагентов и продуктов реакции. Эти трудности были решены с получением так называемых иммуобилизованных ферментов, а также иммуобилизованных клеток микроорганизмов. Начало этому методу было положено в 1916 г., когда Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Существует ряд определений понятия иммуобилизации, но наиболее часто используются следующие.

Иммуобилизация – это любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.

Иммуобилизация ферментов – это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности. Известны различные способы иммуобилизации ферментов.

Обычно все методы иммуобилизации подразделяют на две большие группы: химические и физические.

При использовании химических методов иммуобилизации между ферментом и носителем образуются ковалентные связи. При этом различают:

1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так – и неорганические материалы. К первым относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, нейлон, ионообменные смолы и

другие, ко вторым – модифицированное пористое стекло, силикагели, силохромы, керамика, металлы и другие материалы.

2. Ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента.

Из всех методов иммобилизации ферментов лишь ковалентное связывание на носителе приводит к прочной фиксации фермента. Важно, чтобы фермент был связан с носителем не в активном центре, а как можно дальше от него. Свойства ковалентно связанных ферментов, их стабильность при изменении рН среды, температуры, концентрации субстрата и других условий могут отличаться от свойств нативных ферментов в ту или иную сторону. Причиной этих изменений могут быть природа носителя, способ иммобилизации, место связывания белка и стерическая ориентация фермента на носителе. При связывании на носителе, как правило, возрастает устойчивость ферментов к действию агентов типа мочевины, разворачивающих полипептидную цепь. Стабильность фермента на неорганическом носителе часто бывает выше, чем при связывании с органическим носителем.

Физические методы иммобилизации [9], не предполагающие связывания фермента с носителем ковалентными связями, включают:

- 1) захват фермента в сетку геля или полимера;
- 2) адсорбцию фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах);
- 3) микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5–300 мкм);
- 4) использование двухфазных систем.

Иммобилизованные ферментные препараты обладают рядом существенных преимуществ при использовании их в прикладных целях по сравнению с нативными предшественниками.

Во-первых, гетерогенный катализатор легко отделить от реакционной среды, что дает возможность:

- а) остановить в нужный момент реакцию;
- б) использовать катализатор повторно;
- в) получать продукт, не загрязненный ферментом.

Последнее особенно важно в ряде пищевых и фармацевтических производств.

Во-вторых, использование гетерогенных катализаторов позволяет проводить ферментативный процесс непрерывно, например, в проточных колоннах, и регулировать скорость катализируемой реакции, а также выход продукта путем изменения скорости потока.

В-третьих, иммобилизация или модификация фермента способствует целенаправленному изменению свойств катализатора, в том числе его специфичности (особенно в отношении к макромолекулярным субстратам), зависимости каталитической активности от рН, ионного состава и других параметров среды и, что очень важно, его стабильности по отношению к различного рода денатурирующим воздействиям.

В-четвертых, иммобилизация ферментов дает возможность регулировать их каталитическую активность путем изменения свойств носителя под действием некоторых физических факторов, таких как свет или звук. На этой основе создаются механо-извучувствительные датчики, усилители слабых сигналов и бессеребряные фотографические процессы. Принцип иммобилизации был применен не только к ферментам, но и к их субстратам, ингибиторам и кофакторам, т.е. веществам, имеющим избирательное сродство к ферментам. Это позволило создать метод выделения и очистки ферментов, основанный на хроматографии по сродству, или аффинной хроматографии. Иммобилизация также может быть применена к целым клеткам, частично разрушенным клеткам или компонентам клеток. В результате внедрения нового класса биоорганических катализаторов – иммобилизованных ферментов перед прикладной энзимологией открылись новые, ранее недоступные пути развития [2; 3].

## **2. Лабораторные работы по разделу 2**

### **Лабораторная работа 5**

#### **Иммобилизация биокатализаторов включением в гели.**

#### **Включение клеток дрожжей в гели агар**

*Цель* – на основе изученных методов иммобилизации клеток научиться получать иммобилизованные биокатализаторы включением клеток дрожжей в агарозные гели, рассмотрев способы получения и физические свойства агар-агара и свойства носителей, используемых для иммобилизации клеток.

С целью наиболее выгодного применения в биотехнологии клеток микроорганизмов, растений и животных широко используются технологии закрепления клеток на или в нерастворимом носителе – иммобилизация. Одним из методов иммобилизации клеток является включение их в полимерные гели. Гель – это такое состояние системы полимер-растворитель, когда макромолекулы полимера соединены в пространственную сетку при помощи достаточно устойчивых связей. Чтобы получить гель с включенными в него клетками, необходимо суспендировать биомассу в растворе гелеобразователей и затем создать условия перехода системы в студенообразное состояние. В результате клетки оказываются окруженными пространственной сеткой набухшего сшитого химическими или физическими связями полимера. Через эту сетку к клеткам поступает субстрат из внешней среды и происходит отвод метаболитов. Для иммобилизации клеток чаще используются полисахариды: агар-агар, каррагинан, альгинаты и т. д. Благодаря наличию в гидрофильных молекулах полисахаридов большого числа электронодонорных и электроноцепторных групп для этих соединений основным типом межмолекулярных нековалентных контактов, ответственных за формирование узлов сетки геля, является водородное связывание и в меньшей степени – гидрофобные и дисперсионные взаимодействия.

## Колориметрический метод определения сахаров

### *Сущность метода*

Метод основан на восстановлении ионов двухвалентной меди редуцирующими сахарами и изменении окраски глицерата меди.

*Материалы и оборудование:* цилиндры, пробирки, пипетки, держатели для пробирок.

*Реактивы:* раствор глицерата меди; стандартный раствор глюкозы с концентрацией 10 мг/мл.

*Приготовление растворов:* раствор глицерата меди готовят перед проведением анализа: к 40 мл раствора NaOH (0,15 г/мл) прибавляют 1 мл чистого глицерина, тщательно перемешивают, затем прибавляют 80 мл раствора сульфата меди (8 г/л).

*Построение градуировочного графика.* В пробирки отмеряют 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл стандартного раствора глюкозы и доводят объем до 1 мл дистиллированной водой. Перемешивают и прибавляют в пробирку 15 мл раствора глицерата меди, снова перемешивают и нагревают пробирки в кипящей водяной бане ровно 6 мин. Вынимают, охлаждают пробирки в холодной воде и измеряют оптическую плотность прозрачного раствора при длине волны 580 нм и толщине светопоглощающего слоя 10 мм.

### *Ход работы*

Анализ исследуемого вещества. Для определения редуцирующих сахаров после охлаждения отбирают в пробирку 1 мл прозрачной вытяжки, прибавляют 15 мл раствора глицерата меди, перемешивают. Пробирку нагревают на кипящей водяной бане 6 минут, охлаждают. После отстаивания отбирают прозрачный раствор и измеряют его оптическую плотность.

### *Обработка результатов*

По градуировочному графику определяют содержание сахаров.

## Иммобилизация клеток дрожжей в геле агар

*Материалы и оборудование:* термостат, водяная баня, секундомер, технические весы, аналитические весы; цилиндры, шприц, стакан на 50 мл, бумажный фильтр, колба на 50 мл.

*Реактивы:* дрожжи сухие; 0,9 %-й раствор NaCl, сухой агар, 3 М раствор хлористого натрия, 5 %-й раствор глюкозы.

### *Ход работы*

Приготовить 50 мл 0,9 %-го раствора NaCl.

1 г сухих дрожжей суспендировать в 4 мл 0,9 %-го раствора NaCl и поставить в термостат на 20 мин при 37 °С для активации дрожжей.

В термостойкий стакан внести 300 мг сухого агара, добавить 10 мл 0,9 %-го раствора NaCl и оставить на 10–15 мин при комнатной температуре для набухания.

Во время инкубации приготовить 50 мл 3 М раствора NaCl. Поставить раствор охлаждаться в холодильник; приготовить 10 мл 5 %-го раствора глюкозы.



После набухания поместить стакан с агаром на кипящую водяную баню, нагревать до полного растворения агара. Смесь непрерывно перемешивать.

Когда агар расплавится, охладить жидкость до 45–50 °С (температура гелеобразования) и быстро влить в него, непрерывно перемешивая, суспензию клеток дрожжей.

Образовавшийся комплекс немедленно перенести в шприц без иглы, капать полученную смесь в охлажденный 3 М раствор NaCl, при этом должны образоваться гранулы геля, содержащие иммобилизованные клетки.

После этого гранулы промыть 0,9 %-м раствором NaCl, отделяя гранулы от промывной жидкости фильтрованием.

Гранулы перенести в стакан с 10 мл 5 %-го раствора глюкозы. Измерить исходную концентрацию глюкозы в растворе (г/л).

Закрывать стакан фильтровальной бумагой, поставить в термостат на 2 часа при 37 °С. Через 2 часа проверить жизнеспособность иммобилизованных клеток: измерить конечную концентрацию глюкозы в растворе (г/л).

#### *Обработка результатов*

По количеству утилизированной глюкозы рассчитать степень конверсии сахаров (в %) иммобилизованными клетками. Сделать заключение о качестве проведенной вами иммобилизации клеток дрожжей в агар-агар.

## **Лабораторная работа 6**

### **Изучение влияния ионов кальция на активность иммобилизованного препарата глюкоамилазы**

*Цель* – осуществить иммобилизацию глюкоамилазы (Глюкозим L400) в агаровый гель, содержащий различное количество ионов кальция. Изучить процесс гидролиза крахмала иммобилизованным препаратом и определить, при какой концентрации ионов кальция активность препарата является максимальной.

*Материалы и оборудование:* термостат с температурами 30 °С, 45–50 °С и 37 °С; фотоэлектроколориметр, кипящая водяная баня; колбы плоскодонные; чашки Петри; скальпель; пипетки на 0,2; 1; 5 и 10 мл; мерный цилиндр; пробирки.

*Реактивы:* 1 %-й раствор крахмала; ацетатный буферный раствор с pH = 4,7; рабочий раствор глюкозооксидазы; калибровочный раствор глюкозы; агар-агар; физиологический раствор; 10 %-й раствор хлористого кальция.

#### *Приготовление растворов*

1. Приготовление растворов крахмала для проведения процесса.

Для приготовления раствора крахмала 0,22 г растворимого крахмала растворяют в 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и кипятят при перемешивании в течение 10 мин на кипящей водяной бане, раствор охлаждают и доводят до 20 мл ацетатным буферным раствором с pH 4,7.

## 2. Иммуобилизация глюкоамилазы. Приготовление растворов геля:

Раствор 1: 200 мг агара суспендируют в 9 мл 0,9 %-го NaCl, нагревают до 100 °С до полного растворения агара и затем охлаждают до 45–50 °С на водяной бане.

Раствор 2: к 200 мг агара добавляют 1 мл 10 %-го раствора хлористого кальция и 8 мл 0,9 %-го NaCl, нагревают до 100 °С и затем охлаждают до 45–50 °С на водяной бане.

Раствор 3: К 200 мг агара добавляют 2 мл 10 %-го раствора хлористого кальция и 7 мл 0,9 %-го NaCl, нагревают до 100 °С и затем охлаждают до 45–50 °С на водяной бане.

Раствор 4: к 200 мг агара добавляют 4 мл 10 %-го раствора хлористого кальция и 5 мл 0,9 %-го NaCl, нагревают до 100 °С и затем охлаждают до 45–50 °С на водяной бане.

Раствор 5: к 200 мг агара добавляют 6 мл 10 %-го раствора хлористого кальция и 3 мл 0,9 %-го NaCl, нагревают до 100 °С и затем охлаждают до 45–50 °С на водяной бане.

Раствор 6: к 200 мг агара добавляют 8 мл 10 %-го раствора хлористого кальция и 1 мл 0,9 %-го NaCl, нагревают до 100 °С и затем охлаждают до 45–50 °С на водяной бане.

К каждому из перечисленных выше растворов добавляют 1 мл исходного раствора препарата глюкоамилазы (Глюкозим L 400) и, не вынимая из водяной бани, быстро и тщательно перемешивают агаровые гели. Полученные агаровые гели, содержащие глюкоамилазу, выливают ровным слоем (2–3 мм толщиной) на ровную поверхность (в чашку Петри). После застывания геля его аккуратно разделяют на квадратные пластинки с размером грани 2–3 мм.

3. Приготовление испытуемого раствора ферментного препарата. Испытуемый раствор ферментного препарата готовят путем разбавления исходного ферментного препарата Глюкозим L 400 в 10 раз.

4. Проведение процесса гидролиза крахмала ферментным препаратом Глюкозим L 400.

В пробирку вносят 1 мл испытуемого раствора ферментного препарата, нагретого до 30 °С, и приливают 2 мл раствора крахмала, нагретого до той же температуры. Смесь инкубируют при 30 °С в течение 10 мин. Затем пробирки выдерживают 2 мин в кипящей водяной бане для инактивации фермента и охлаждают в проточной воде. В полученных гидролизатах определяют содержание глюкозы глюкозооксидазным методом.

5. Проведение процесса гидролиза крахмала иммобилизованным ферментным препаратом Глюкозим L 400.

На весах отвешивают две навески по 0,5 г иммобилизованного препарата глюкоамилазы, каждую из которых переносят в пробирку. В каждую пробирку приливают 2 мл раствора крахмала, нагретого до температуры 30 °С. Смесь инкубируют при 30 °С в течение 10 мин. Затем жидкость из пробирки сливают в чистую пробирку и

выдерживают 2 мин в кипящей водяной бане для инактивации фермента, охлаждают в проточной воде. В полученных гидролизатах определяют содержание глюкозы глюкозооксидазным методом.

6. Определение глюкозы в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом. Для приготовления реактивов используют специальный набор реактивов для определения глюкозы в биологических жидкостях.

#### *Ход работы*

В 3 пробирки вносят реактивы следующим образом:

- *контрольная проба* – 2 мл рабочего раствора глюкозооксидазы;
- *опытная проба* – 0,2 мл раствора, в котором определяется содержание глюкозы и 2 мл рабочего раствора глюкозооксидазы;
- *калибровочная проба* – 0,2 мл калибровочного раствора глюкозы (1,0 ммоль/л) и 2 мл рабочего раствора глюкозооксидазы.

Пробирки инкубируют 15 мин при температуре 37 °С или 30 мин при 20 °С. Через 5–10 минут после начала инкубации пробирки интенсивно встряхивают. После окончания инкубации определяют оптическую плотность при длине волны 510 нм (470–540 нм, зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы. Окраска устойчива в течение 1 часа после окончания инкубации.

#### *Обработка результатов*

Содержание глюкозы в полученных гидролизатах находят по следующей формуле (13):

$$c = \frac{D_0}{D_k} \cdot 10, \quad (13)$$

где С – содержание глюкозы в опытной пробе, ммоль/л (мкмоль/мл);

$D_0$  – оптическая плотность опытной пробы;

$D_k$  – оптическая плотность калибровочной пробы;

10 – содержание глюкозы в калибровочной пробе, ммоль/л.

Приготовление рабочего раствора глюкозооксидазы описано выше.

### **Определение активности фермента**

За единицу глюкоамилазной активности принимают такое количество фермента, которое, действуя на растворимый крахмал, за 1 мин при 30 °С и рН 4,7 высвобождает 1 мкмоль глюкозы, составляющий 10 % от всей глюкозы, образующейся при полном превращении крахмала.

Для определения активности нативного фермента используют следующую формулу (14):

$$ГЛА = \frac{c}{A \cdot 10}, \quad (14)$$

где С – количество образовавшейся глюкозы мкмоль/мл;

А – количество исследуемого ферментативного материала (г или мл) в 1 мл гидролизата;

10 – пересчет действия фермента на 1 мин.

Для определения активности иммобилизованного фермента используют следующие формулы: активность иммобилизованного препарата (15), удельная активность иммобилизованного препарата (16):

$$\text{ГлАи} = \frac{C}{B \cdot 10}, \quad (15)$$

где С – количество образовавшейся глюкозы, мкмоль/мл;

В – навеска исследуемого иммобилизованного фермента, взятая для проведения гидролиза, г;

10 – пересчет действия фермента на 1 мин.

$$\text{УГлАи} = \frac{C}{B \cdot 10}, \quad (16)$$

где С – количество образовавшейся глюкозы, мкмоль/мл;

В – количество фермента (мл), содержащегося в навеске исследуемого иммобилизованного фермента;

10 – пересчет действия фермента на 1 мин.

Для каждого из растворов 1–6 произвести расчеты и полученные данные занести в таблицу 5.

Таблица 5 – Результаты работы

Концентрация хлористого кальция, моль/л	ГлА, мкмоль/мл·мин	ГлАи, мкмоль/г·мин	УГлАи, мкмоль/мл·мин

Определить, при какой концентрации ионов кальция активность иммобилизованных препаратов максимальна. Определить, как меняется удельная активность иммобилизованных препаратов глюкоамилазы по сравнению с исходной, и сделать выводы.

### 3. Вопросы к конференции

#### Конференция по теме «Иммобилизованные ферменты»

##### I. Носители для иммобилизованных ферментов.

##### 1. Органические полимерные носители:

- природные носители (полисахариды, белки);
- синтетические полимерные носители (полимеры на основе стирола, полимеры на основе производных акриловой кислоты, полиамидные носители, носители на основе поливинилового спирта, полиуретаны);

– активация полимерных носителей (активация гидроксильных и амино- групп носителей, активация карбоксильных групп носителей, модификация амидных групп, модификация бензольного ядра);

– биодegradация полимерных носителей;

– органические низкомолекулярные носители;

– природные носители – липиды;

– синтетические аналоги липидов (поверхностные активные вещества).

2. Неорганические минералы – носители для иммобилизованных ферментов.

II. Методы физической иммобилизации ферментов.

1. Иммобилизация ферментов путем адсорбции на нерастворимых носителях.

2. Иммобилизация ферментов путем включения в гель.

3. Иммобилизация ферментов с использованием систем двухфазного типа.

III. Химические методы иммобилизации ферментов.

1. Основные принципы конструирования препаратов ковалентно иммобилизованных ферментов.

2. Химическая структура ферментов и их функциональные группы.

3. Приемы химической (ковалентной) иммобилизации белков:

– реакции образования амидной связи;

– реакции образования карбамидных связей (производных мочевины);

– реакции образования вторичных аминов (-NH – связь);

– реакции азосочетания (образование азосоединений со связью);

– реакции тиол-дисульфидного обмена (образование –S-S- связи);

– радикальные реакции (графтсополимеризация).

IV. Применение иммобилизованных ферментов.

1. Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов:

– получение глюкозо-фруктозного сиропа;

– получение L-аминокислот;

– получение L-Асп;

– получение L-Малата;

– получение безлактозного молока;

– получение сахаров из молочной сыворотки;

– получение 6-аминопеницилановой кислоты;

– процессы на уровне опытных установок.

2. Иммобилизованные ферменты в микроанализе:

– аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами;

– ферментные микрокалориметрические датчики;

– ферментные электроды;

– биолюминесцентный микроанализ;

– области применения биосенсоров с иммобилизованными ферментами.

3. Иммобилизованные ферменты в медицине.

#### 4. Задания для самопроверки

1. Иммобилизация индивидуальных ферментов ограничивается таким обстоятельством, как:

- а) высокая лабильность фермента,
- б) наличие у фермента кофермента,
- в) наличие у фермента субъединиц,
- г) принадлежность фермента к гидролазам.

2. Иммобилизация клеток продуцентов целесообразна в случае, если целевой продукт:

- а) растворим в воде,
- б) не растворим в воде,
- в) локализован внутри клетки,
- г) им является биомасса клеток.

3. Химический метод иммобилизации ферментов:

- а) образование ковалентных связей между носителем и ферментом,
- б) включение фермента в микрокапсулы,
- в) включение фермента в полимерные гели,
- г) включение фермента в волокна полимера.

4. В основе металлохелатного метода иммобилизации лежит:

- а) образование химической связи между молекулами фермента и носителя;
- б) действие электростатических сил и сил поверхностного натяжения;
- в) свойства переходных металлов образовывать комплексы;
- г) удержание раствора, окружающего фермент.

5. В основе метода иммобилизации «адсорбция на носителе» лежит:

- а) образование химической связи между молекулами фермента и носителя;
- б) действие электростатических сил и сил поверхностного натяжения;
- в) свойство переходных металлов образовывать комплексы;
- г) удержание раствора, окружающего фермент.

6. В основе метода иммобилизации «включение в гель» лежит:

- а) образование химической связи между молекулами фермента и носителя;
- б) действие электростатических сил и сил поверхностного натяжения;
- в) свойство переходных металлов образовывать комплексы;
- г) удержание раствора, окружающего фермент;
- д) полная полимеризация носителя.

7. Достоинства органических носителей для иммобилизации:

- а) легко подвергаются химической модификации,
- б) жесткий каркас,
- в) высокая механическая прочность,
- г) возможность изменения структуры и размеров пор,
- д) микробиологическая устойчивость.

8. В биотехнологическом производстве основной целью иммобилизации ферментов является:

- а) повышение удельной активности,
- б) многократное использование,
- в) повышение стабильности,
- г) расширение субстратного спектра,
- д) повышение селективности.

## **Раздел 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НА ОСНОВЕ ПРОЦЕССА БРОЖЕНИЯ**

### **1. Биохимические основы процесса брожения**

Микробиологический синтез составляет основу биотехнологических производств, разнообразие которых определяется свойствами используемых микроорганизмов, являющихся продуцентами биологически активных веществ.

Важнейшими преимуществами микробиологического синтеза являются использование дешевого сырья, часто в виде промышленных отходов; возможность синтеза сложных органических соединений в одну стадию в мягких условиях (низкая температура, невысокое давление).

Эффективность микробиологического синтеза определяется прежде всего возможностями микроорганизмов – продуцентов целевых продуктов. К промышленным продуцентам предъявляются определенные требования, в числе которых:

- высокая скорость роста;
- непатогенность штаммов, нетоксичность биомассы;
- термотолерантность;
- высокий выход биомассы (или метаболита) от субстрата;
- фагоустойчивость;
- легкость выделения клеток из культуральной жидкости;
- конкурентоспособность, устойчивость в процессе непрерывного культивирования;
- возможность культивирования в нестерильных условиях;
- минимальное накопление второстепенных продуктов метаболизма в культуральной жидкости.

Брожение – эволюционно наиболее древний и примитивный способ получения энергии, характерный для ряда групп прокариот. Основные типы брожений: спиртовое, молочнокислое и маслянокислое – открыты Л. Пастером (1860-е гг.), хотя продукты брожений были известны человеку с незапамятных времен.

Современная биотехнология широко распространена в пищевой промышленности и является основой технологии производства многих пищевых продуктов. Так, хлеб, вино, квас, спирт – продукты, в производстве которых главную роль играют микроорганизмы – дрожжи.

Различные микроорганизмы используются при производстве сыров и кисломолочных продуктов. Под действием уксуснокислых бактерий вино и этиловый спирт превращаются в уксусную кислоту. Лимонную кислоту получают путем микробного биосинтеза из сахаросодержащего сырья. Молочную кислоту получают путем брожения молочнокислых бактерий из глюкозы. Глютаминовая кислота синтезируется



микроорганизмами – бактериями родов *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*. Глюкозо-фруктозные сиропы, пищевой белок, некоторые витамины, антибиотики – это также продукты биотехнологий [1].

В пищевой промышленности широко используются такие микроорганизмы, как дрожжи, молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии, плесени. Эти микроорганизмы различаются по строению, размерам, способу размножения, реакции со свободным кислородом, условием роста, способности действовать на различные субстраты. Но они сходны в том, что активно развиваются и содержат биохимические катализаторы – ферменты, при помощи которых катализируют вызываемые ими реакции [13].

Живые клетки микроорганизмов продуцируют множество различных ферментов, которые подразделяются на два типа: экзоферменты и эндоферменты. Экзоферменты выделяются клетками и действуют вне клеток на органические вещества среды – углеводы, белки, жиры. Эндоферменты образуются и остаются внутри живых клеток и катализируют изменение или разложение (диссимиляцию) питательных веществ внутри клеток. Продукты разложения могут входить в клеточную протоплазму или выделяться через оболочку клетки в среду [6].

Микроорганизмы брожения нашли широкое техническое применение благодаря тому, что они легко культивируются, быстро развиваются в благоприятных питательных средах, синтезируют большое число ферментов, вызывающих соответствующие химические изменения сложных органических веществ в сравнительно простых производственных условиях, и сохраняют в этих условиях физиологическое постоянство.

Различают три основные группы бродильных производств:

- производства, основанные на применении дрожжей (производство этилового спирта, глицерина, хлебопекарных и кормовых дрожжей, вина, пива, кваса);
- производства, основанные на применении бактерий (производство органических растворителей – ацетона и бутилового спирта; уксусной, молочной, масляной, пропионовой кислот);
- производства, основанные на применении плесневых грибов (производство лимонной, глюконовой, итаковой, фумаровой кислот).

Производства первой группы относятся к бродильной промышленности, а производства второй и третьей группы – к микробиологической промышленности [6].

## **2. Лабораторные работы по разделу 3**

### **Лабораторная работа 7**

#### **Виды брожений. Молочнокислое брожение**

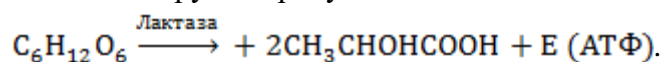
*Цель* – познакомиться с химизмом молочнокислого брожения, с качественными реакциями на молочную кислоту, с морфологией молочнокислых бактерий.

*Материалы и оборудование:* колбы на 50 мл, пипетки на 10 мл, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, настольные лампы, стеклянные штативы с кристаллизаторами, промывалки.

*Реактивы:* свежее и кислое молоко; ряженка, простокваша, кислые сливки, сметана, кефир; сливочное масло; рассолы капусты, огурцов; 0,1 Н раствор NaOH; 10 %-й раствор серной кислоты; насыщенный р-р CuSO<sub>4</sub>, 2 %-й раствор спиртового тиофена, 2 %-й раствор KMnO<sub>4</sub>, 0,5 %-й аммиачный раствор AgNO<sub>3</sub>, 5 %-й спиртовой раствор фенола, концентрированная H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 %-й раствор FeCl<sub>3</sub>, раствор фенолфталеина, водный раствор метиленового синего, жидкость Никифорова, раствор генцианвиолета, раствор Люголя, 96 %-й раствор этанола, раствор карболового фуксина, дистиллированная вода.

### Химизм молочнокислого брожения

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов:



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы:

- гомоферментативные, когда продукт разложения – молочная кислота;
- гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO<sub>2</sub> и др.

К первой группе относятся: молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки.

### Представители гомоферментативного брожения

*Молочнокислый стрептококк (Streptococcus lactis).* Имеет вид овальных кокков диаметром 0,5–1 мкм, которые располагаются в культуре попарно. Это диплококки, а короткими цепочками – стрептококки. Микроорганизмы грам(+), оптимальная температура развития – 30–35 °С. Сбраживает молочный сахар (лактозу), а также мальтозу. Молоко свертывается через 10–12 часов.

*Сливочный стрептококк (Streptococcus cremoris).* Встречается в молочнокислых продуктах с большой жирностью, имеет вид более длинных цепочек. Используется для производства масла, сыров и сметаны.

*Болгарская палочка (Lactobacterium bulgaricum).* Неподвижная, грам(+), располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек. Оптимальная температура ее развития – 40–45 °С.

*Ацидофильная палочка (Lactobacterium acidophilum).* По морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития – 37 °С. Используется для изготовления ацидофилина.

*Огуречная палочка (Lactobacterium cucumeris).* Короткая, грам(+), бактерия, неподвижная. Развивается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

Ко второй группе гетероферментативных бактерий относятся капустная палочка, ряд лактобацилл (*Lactobacillus plantarum*, *L. Fermenti*, *L. brevis*), а также кефирные дрожжи и молочная плесень. Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они всегда имеются в почве, на поверхности растений, что является источником их постоянного появления в молочных и других продуктах. В промышленности используют культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

### Представители гетероферментативного брожения

*Капустная палочка (Lactobacterium brassicae)*. Вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, грам(+), сцеплена в пары и цепочки. Оптимум развития  $-25^{\circ}\text{C}$ . В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовых бактерий, попадающих в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

*Кефирные дрожжи (Saccharomyces kefir)*, переводящие молочный сахар (лактозу) в спирт, небольшое количество которого вырабатывается этими организмами.

*Молочная плесень (Oidium lactis)*. Можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах, имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими размерами. Окисляет молочную кислоту до  $\text{CO}_2$  и воды, ухудшая качество скисшего молока.

#### Ход работы

Сделать качественные реакции на молочную кислоту, записать уравнения реакций.

Определить кислотность молока, вычислить количество молочной кислоты в 100 мл молока и увеличение кислотности по мере скисания молока.

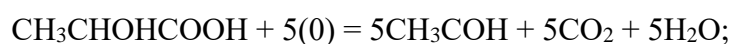
Познакомиться с морфологией молочнокислых бактерий. Приготовить препараты, окрасить метиленовым синим и по Граму, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.

### Качественные реакции на молочную кислоту

1. *Определение уксусного альдегида*. Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата добавляют 1 мл 10 %-го раствора серной кислоты, нагревают в конической колбе до кипения, затем по каплям прибавляют 2 %-й раствор (2 мл)  $\text{KMnO}_4$ . В этих условиях происходит окисление молочной кислоты с  $\text{KMnO}_4$  до  $\text{CH}_3\text{COH}$  (уксусный альдегид):



Затем покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра (смачивают бумагу вначале 0,5 %-м раствором  $\text{AgNO}_3$ , затем раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Бумага темнеет под влиянием паров уксусного альдегида:



2. *Реакция Уффельмана (проба с фенолом)*. В пробирку к 10 мл 5 %-го раствора фенола добавить несколько капель 5 %-го раствора хлорного железа ( $\text{FeCl}_3$ ). Наблюдаем образование интенсивно окрашенного синего раствора. Прибавление одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, делает раствор желтоватым.

3. *Реакция со спиртовым раствором тиофена*. Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр. К 2 мл фильтрата добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 10 капель насыщенного раствора медного купороса.

Нагревают при потряхивании на водяной бане при  $100\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 5 мин. При охлаждении добавляют три-пять капель 0,2 %-го раствора тиофена в спирту. В присутствии молочной кислоты возникает вишнево-красное окрашивание.

### Определение кислотности молока

В широкодонную колбу объемом 150 мл наливают 40 мл свежего молока, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре  $30\text{--}35\text{ }^\circ\text{C}$  до следующего занятия. В другой порции молока определяют его исходную кислотность. Для этого в коническую колбу на 50 мл наливают 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и две-три капли фенолфталеина. Смесь тщательно взбалтывают и титруют 0,1 Н раствором едкого натра до слабо-розовой окраски индикатора.

#### *Обработка результатов*

Рассчитывают кислотность в градусах Тернера. Градус Тернера ( $^\circ\text{T}$ ) – условная величина, равная количеству миллилитров 0,1 Н раствора щелочи, израсходованного на нейтрализацию 100 мл молока.

Пример расчета: на титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1 Н раствора щелочи; рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока:

5 мл щелочи – 10 мл молока;

x мл щелочи – 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит:  $X = \frac{5 \cdot 100}{10} = 50\text{ }^\circ\text{T}$ .

Кислотность парного молока колеблется от 10 до  $25\text{ }^\circ\text{T}$ .

Предельная кислотность молока колеблется от 110 до  $115\text{ }^\circ\text{T}$ .

### Приготовление препаратов из молочнокислых продуктов

Нанести одну каплю какого-либо молочного продукта на предметное стекло, разбавить с каплей дистиллированной воды и сделать тонкий мазок, чуть подсушить на воздухе, а затем зафиксировать с одновременным обезжириванием смесью Никифорова (не менее 10 мин.). Окраску производят в течение 3–5 мин водным раствором метиленового синего, промывают водой, высушивают и микроскопируют с применением иммерсионного микроскопа.

Микрофлору рассолов капусты и огурцов препарируют обычным способом, без обезжиривания смесью Никифорова. Окраску мазка производят метиленовым синим или карболовым фуксином 3–5 мин.

## Лабораторная работа 8

### Виды брожений. Спиртовое брожение

*Цель* – познакомиться с химизмом и качественными реакциями спиртового брожения, с морфологией возбудителей этого вида брожения.

*Материалы и оборудование:* спиртовки или плитки, колба объемом 200–250 мл, пробка с газоотводной трубкой, штатив.

*Реактивы:* дрожжи пекарские, 10 %-й раствор сахарозы, 10 %-й раствор гидроксида натрия, йод кристаллический,  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  или  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , концентрированная серная кислота,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  кристаллический.

#### *Приготовление растворов*

За час до занятия настоять в колбе дрожжи: 50 мл 10 %-го раствора сахарозы и около 1 г дрожжей.

#### *Химизм и представители спиртового брожения*

Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе – дикие дрожжи. К ним относятся дрожжевые грибы рода *Mycoderma* и *Torula*, плесневые грибы рода *Mucor* и некоторые бактерии. Культурные дрожжи выведены путем длительной селекции из диких дрожжей. К ним относятся *Saccharomyces cerevisiae* и *S. vini*, *S. ellipsoides*. Эти дрожжи отличаются от диких тем, что способны выдерживать большие концентрации спирта в среде, образуют меньше побочных продуктов брожения, вследствие чего интенсивнее идут процессы брожения. Спиртовое брожение идет в анаэробных условиях, тогда как размножение дрожжей происходит при широком доступе кислорода при оптимальных температурах 30–35 °С. Образующийся спирт вреден для дрожжей, и при накоплении его брожение прекращается. Однако при высокой концентрации сахара в растворе дрожжи могут оставаться живыми в среде, содержащей до 15 % спирта. Суммарно процесс брожения выражается следующим уравнением:



#### *Ход работы*

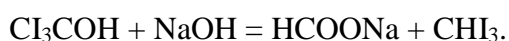
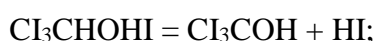
Познакомиться с химизмом и морфологией микроорганизмов, приготовить препараты, окрасить, зарисовать.

Выполнить качественные реакции, записать уравнения реакций.

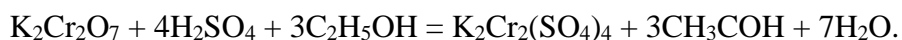
Провести измерения размеров клеток дрожжей.

#### **Качественные реакции на брожение**

1. *Реакция с кристаллическим йодом.* К 10 мл бродящей жидкости в пробирку добавить 1–2 мл раствора 10 %-й щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения (60 °С). Затем добавляют несколько кристалликов йода и снова нагревают. В присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, имеющий характерный запах:



2. *Реакция с двухромовокислым калием.* В пробирку с 2–3 мл исследуемой жидкости добавляем кристаллик двухромовокислого калия и несколько капель концентрированной серной кислоты, смесь нагреваем на спиртовке. Цвет меняется до зеленого вследствие восстановления хрома:



Выделяющийся уксусный альдегид ощутим по запаху.

3. *Обнаружение углекислого газа.* В колбу емкостью 250 мл наливают 50 мл 10 %-го раствора сахарозы и около 1 г пекарских дрожжей, предварительно разведенных в 10 мл 10 %-го раствора сахарозы. Колбу закрывают пробкой с изогнутой трубкой, нижний конец которой погружают в пробирку с баритом или с известковой водой. Колбу с бродящей жидкостью помещают в водяную баню на плитке, где поддерживается температура 35–40 °С с периодическим подогреванием. Через несколько минут после установки в пробирку с баритом начинают поступать пузырьки газа, со временем ток их становится равномерным. Баритовая вода начинает интенсивно мутнеть. Следят за выделением пузырьков и помутнением жидкости.

## Лабораторная работа 9

### Виды брожений. Уксуснокислое брожение

*Цель* – знакомство с химизмом процесса брожения, морфологией микроорганизмов.

*Материалы и оборудование:* полоски фильтровальной бумаги, предметные стекла, спиртовки.

*Реактивы:* кислое пиво, чайный гриб, 10 %-й раствор соды, 10 %-й раствор хлорного железа ( $\text{FeCl}_3$ ), раствор йода, раствор Люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет.

*Ход работы*

Рассмотреть и описать микроорганизмы, зарисовать их с живых и фиксированных препаратов. Живые препараты приготовить методом раздавленной капли и висячей капли из пленки и раствора чайного гриба, кислого пива, подкрасить раствором Люголя. Мазки окрасить по Граму.

Сделать качественную реакцию на уксусную кислоту. Процесс уксуснокислого брожения вызывается группой бактерий, являющихся облигатными аэробами. Они окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты и воды в строго аэробных условиях:



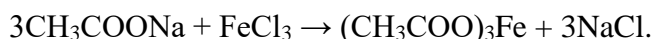
При этом выделяется значительное количество энергии. Различные продукты, содержащие алкоголь (спирт, вино, пиво), являются благоприятным субстратом для развития уксуснокислых бактерий, попадающих сюда из воздуха.

Эти бактерии встречаются повсеместно в природе, пыли, на фруктах, овощах. Уксуснокислые бактерии объединены в род *Acetobacter*. На поверхности растворов бактерии образуют пленки, состоящие из полисахаридов. Типовой вид *Acetobacter aceti* представлен слабоподвижными палочковидными эллиптическими клетками, одиночными, в парах или цепочках с размерами 0,6–0,8 x 1,0–3,0 мкм. Это беспоровые грамм-отрицательные палочки, облигатные аэробы. Они растут и размножаются на поверхности питательных сред, образуя тонкие пленки. Нередко образуют инволюционные

формы в виде раздутых, разветвленных или нитевидных образований. *Acetobacteraceti* образует гладкую слизистую пленку, желтеющую от раствора йода. Палочка активно развивается при температуре около 34 °С, выносит концентрацию уксусной кислоты до 6 %. *Acetobacter xylinum* образует в культуре грубую, морщинистую, слизистую пленку значительной толщины. Клетки окрашиваются йодом в синий цвет. Бактерии живут в пленке чайного гриба, в сообществе с дрожжами. Такой симбиоз взаимовыгоден: дрожжи сбраживают сахар до спирта, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты. *Acetobacter pasteurianum* образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашивающуюся от йода в синий цвет. Форма бактерий морфологически близка к *Ac. acetii*. Развивается на алкогольных напитках.

### Проведение качественной реакции на уксусную кислоту

*Закладка опыта:* за неделю-полторы до занятия в конические колбы наливают тонкий слой пива (1 см). Толщина слоя пива имеет большое значение для исхода опыта, так как для уксуснокислых бактерий должны быть созданы аэробные условия. К пиву добавляют немного (0,5 мл) спирта. Колбы закрывают ватными тампонами и ставят в термостат при температуре 30–35 °С на несколько суток. Содержимое колб анализируют, описывают характер образовавшихся пленок, микроскопируют окрашенные мазки, делают качественную реакцию на CH<sub>3</sub>COOH. Для этого к 5 мл скисшего пива в пробирку добавляют 2 мл 10 %-го раствора соды и немного хлорного железа (3) той же концентрации. Смесь нагревают. При наличии уксусной кислоты появляется красное окрашивание вследствие образования ацетата железа:



## Лабораторная работа 10

### Виды брожений. Маслянокислое брожение

*Цель* – познакомиться с морфологией, химизмом, качественными реакциями маслянокислого брожения.

*Материалы и оборудование:* водяная баня, термостат, предметные стекла, спиртовки.

*Реактивы:* 5 %-й раствор FeCl<sub>3</sub>, 95 %-й раствор этилового спирта, концентрированная серная кислота, фуксин, раствор Люголя, культура картофельной палочки.

*Ход работы*

Познакомиться с закладкой опыта культуры маслянокислых бактерий, химизмом процесса брожения.

Приготовить препараты маслянокислых бактерий методами раздавленной капли и мазка.

Выполнить качественные реакции на масляную кислоту. Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в масляную кислоту и другие продукты, совершаемый группой анаэробных спороносных бактерий. Химизм этого процесса сложен и до настоящего времени недостаточно выяснен. Схематично процесс можно выразить следующим образом:

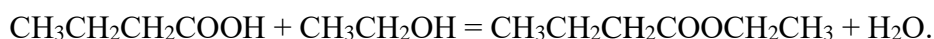


Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием сложных различных активных ферментов маслянокислых бактерий. Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений. Маслянокислое брожение вызывается облигатными анаэробными бактериями из рода *Clostridium*. За неделю-полторы до занятия закладывают опыт. Для этого неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками, которыми заполняют пробирку на  $\frac{1}{3}$  объема, добавляют щепотку мела и заполняют водой почти доверху. Пробирки помещают в водяную баню при температуре 80 °С на 10–15 мин, затем закрывают пробками и ставят в термостат с температурой 35 °С. В этих условиях уже через два-три дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения.

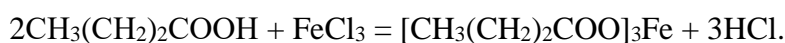
Культура маслянокислых бактерий является при этом элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспорные формы других видов, убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий. Другой способ получения культуры маслянокислых бактерий: 5 г ячменя (солода), 2 г мела, 5 г сахара – всё заливают водой (100 мл) и кипятят в течение 5 мин. Горячую жидкость переливают в высокую пробирку, на дно которой бросают кусочек почвы или семени гороха. Пробирку держат в термостате при 30–35 °С семь дней. На следующем занятии производят микроскопирование жидкости, в которой обнаруживают главным образом *Clostridium pasteurianum*, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают споры. *Clostridium pasteurianum* – свободноживущий анаэробный азотфиксатор, обитающий в почве. В клетках этих бактерий содержится гранулеза, которая окрашивается раствором Люголя в синий цвет. Ее можно видеть при микрокопировании живых бактерий в капле суспензии культуральной жидкости с добавкой реактива методом раздавленной капли с масляной иммерсией. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой. С культуральной жидкостью проводят качественные реакции на масляную кислоту.

### Качественные реакции

1. К 3–4 мл жидкости в пробирку добавляют 0,5 мл 95 %-го спирта и одну-две капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки хорошо взбалтывают и нагревают. В присутствии масляной кислоты появляется запах масляно-этилового эфира, напоминающий запах ананаса:



2. К 5 мл исследуемой жидкости добавить 2 мл 5 %-го  $\text{FeCl}_3$ . При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета:





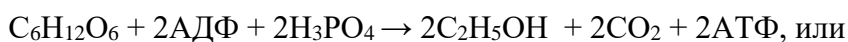
## Лабораторная работа 11

### Спиртовое брожение как модель биотехнологического производства

*Цель* – познакомиться с этапами биотехнологического производства на примере производства спирта.

Моделью биотехнологического производства может быть микробиологический способ производства спирта. Микроорганизмами служат дрожжи. Сырьем являются углеводы.

Суммарная реакция брожения:



Спиртовое брожение протекает в несколько стадий. В начальный период, когда в среде достаточно кислорода, дрожжи окисляют сахара до  $CO_2$  и  $H_2O$  (процесс дыхания) и интенсивно размножаются. Брожение в данный момент протекает слабо. Вот почему на дрожжевых заводах процесс выращивания дрожжей ведут при постоянном притоке воздуха. Затем в результате обеднения среды кислородом дыхание клеток ослабевает и начинается интенсивное брожение. Энергия брожения не обеспечивает высокого уровня размножения клеток. В этот период наблюдается увеличение размеров клеток и накопление в них гликогена.

В последующих стадиях брожения сахара в среде остается мало, дрожжи используют накопленный гликоген, содержание которого в клетке резко падает. Это свидетельствует об окончании брожения.

*Материалы и оборудование:* электронные весы, водяная баня, термостат, колбы конические объемом 100 мл, 250 мл, 500 мл; цилиндр, пробирки, бюретка, штатив с лапками.

*Реактивы:* сахар, гидрофосфат аммония  $(NH_4)_2HPO_4$ ; сульфат аммония  $(NH_4)_2SO_4$ ; хлорид калия KCl; сульфат магния  $MgSO_4$ ; 70 %-я ортофосфорная кислота; аммиачная вода; универсальная индикаторная бумага.

#### *Ход работы*

Приготовить 250 мл питательной среды следующего состава: сахар – 9 %; гидрофосфат аммония  $(NH_4)_2HPO_4$  – 0,3 %; сульфат аммония  $(NH_4)_2SO_4$  – 0,16 %; хлорид калия KCl – 0,06 %; сульфат магния  $MgSO_4$  – 0,02 %. Замерить величину pH раствора и довести при необходимости до 4,5 70 %-й ортофосфорной кислотой или аммиачной водой.

Простерилизовать питательную среду на кипящей водяной бане в течение 30 мин в колбе на 250 мл, закрытой ватным тампоном. Повторить эту операцию еще 2 раза с интервалом в 1 час.

Отобрать в пробирку 15 мл исходной смеси для определения в ней содержания сахара и усвояемого азота.

В колбу на 100 мл налить 75 мл стерильной питательной среды и внести 1,0 г пекарских дрожжей. Колбу поместить в термостат при 25–30 °C и оставить на сутки.

Провести определение содержания сахара в питательной среде до начала культивирования дрожжей и после окончания процесса брожения йодометрическим методом.

**Йодометрический метод.** Основой йодометрического метода является способность редуцирующих сахаров (глюкозы и мальтозы) окисляться йодом до соответствующих кислот.

*Холостой опыт.* Определению предшествует холостой опыт, в котором определяется соотношение между приготовленными 0,1 Н растворами йода (25,0 мл) и тиосульфата натрия. 10 мл дистиллированной воды пипеткой переносят в коническую колбу вместимостью 250–400 мл, туда же отмеривают пипеткой 25,0 мл 0,1 Н раствора йода и медленно приливают из бюретки 30,0 мл 0,1 Н раствора гидроксида натрия. Содержимое колбы тщательно перемешивают, накрывают колбу часовым стеклом или закрывают пробкой и ставят в темное место на 15–20 мин. Затем вносят 4,5–5 мл 1 Н раствора серной кислоты и титруют 0,1 Н раствором тиосульфата натрия до светло-желтого окрашивания, в конце добавляют 1 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

#### *Анализ продукта брожения*

Основной раствор (бражку), содержащий сахарозу, разбавляют в 10 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривают пипеткой 10 мл бражки, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

10 мл полученного раствора пипеткой переносят в коническую колбу вместимостью 250–400 мл, туда же отмеривают пипеткой 25,0 мл 0,1 Н раствора йода и медленно приливают из бюретки 30,0 мл 0,1 Н раствора гидроксида натрия. Содержимое колбы тщательно перемешивают, накрывают колбу часовым стеклом или закрывают пробкой и ставят в темное место на 15–20 мин. Затем вносят 4,5–5 мл 1 Н раствора серной кислоты и титруют 0,1 Н раствором тиосульфата натрия до светло-желтого окрашивания, в конце добавляют 1 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Массовую долю редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество (%) определяют по формуле (18):

$$P_B = \frac{(V_0 - V) \cdot 9 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{200 \cdot c}, \quad (18)$$

где  $V_0$  – объем 0,1 Н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование 25 мл 0,1 Н раствора йода в холостом опыте, мл;

$V$  – объем 0,1 Н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование при анализе, мл;

9 – масса глюкозы, соответствующая 1 мл 0,1 Н раствора тиосульфата натрия, мг;

$K$  – поправочный коэффициент к нормальности раствора тиосульфата натрия;

200 – масса сахарозы, содержащаяся в 10 мл разбавленного основного раствора, мг;

$c$  – массовая доля сухого вещества сахарозы, %.

Определить начальное и остаточное количество усвояемого азота формальным титрованием.

**Формольное титрование (определение количества усвояемого азота).** 10 мл бражки разбавляют 90 мл дистиллированной воды, добавляют 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,1 Н раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания (первое титрование). Затем туда же приливают 5 мл нейтрального 40 %-го формалина и титруют вторично тем же раствором NaOH опять до слабо-розового окрашивания (второе титрование).

Число миллилитров 0,1 Н раствора NaOH, пошедшее на вторичное титрование, характеризует формольное число испытуемой жидкости. Эта величина относительная и показывает количество растворенного в среде аммонийного и аминного азота.

Провести качественные реакции на конечный продукт спиртового брожения.

#### **Качественные реакции на этанол**

1. 5 мл жидкости пипеткой перенести в пробирку, добавить немного 10 %-го раствора NaOH и осторожно нагреть, не доводя до кипения. Добавить несколько кристаллов йода и снова нагреть. Жидкость окрашивается в желтый цвет и появляется запах йодоформа, что свидетельствует о наличии в среде этилового спирта.

2. К 5 мл испытуемой жидкости добавить кристаллик бихромата калия  $K_2Cr_2O_7$  и несколько капель концентрированной серной кислоты. Смесь нагреть. Жидкость приобретает зеленый цвет вследствие восстановления хрома. Выделяющийся уксусный альдегид ощущается по запаху, что свидетельствует о присутствии спирта в среде.

#### **Обработка результатов**

Заполнить таблицу 8 и проанализировать данные.

Таблица 8 – Технологические характеристики роста дрожжей в условиях глубинной ферментации

Технологическая характеристика	Начало опыта	Конец опыта
Время отбора пробы, сут.	0	3
pH среды		
Температура среды, °C		
Концентрация сахара, %		
Количество растворенного азота в среде		

## **Лабораторная работа 12**

### **Микробиологический синтез на примере спиртового брожения (школьный вариант)**

*Цель* – познакомить обучающихся с этапами биотехнологического производства на примере производства этилового спирта.

#### **1. Приготовление и стерилизация питательной среды и выращивание посевного материала**

*Материалы и оборудование:* коническая или плоскодонная колба объемом 250 мл, стеклянные палочки, водяная баня, термостат, коническая или плоскодонная колба объемом 50 мл, цилиндры объемом 100 мл и 250 мл.

*Реактивы:* сахар, дрожжи, вода.

### *Ход работы*

Приготовить 200 мл 10 %-го раствора сахара и простерилизовать его на кипящей водяной бане в течение 30 мин в колбе на 250 мл, закрытой ватным тампоном. Повторить эту операцию еще 2 раза с интервалом в 1 час.

В колбу на 50 мл налить 25 мл стерильной питательной среды и внести 0,5 г пекарских дрожжей. Колбу поместить в термостат при 25–30 °С и оставить на сутки.

### **2. Спиртовое брожение**

*Материалы и оборудование:* термостат, микроскоп, водяная баня, электрическая плитка, коническая или плоскодонная колба объемом 250 мл с пробкой и газоотводной трубкой, пробирки, предметные и покровные стекла, пипетки.

*Реактивы:* баритовая вода (свежеприготовленная), 10 %-й раствор сахара, раствор Люголя.

### *Ход работы*

В колбу на 250 мл налить 150 мл 10 %-го раствора сахара, нагреть на водяной бане до температуры культивирования дрожжей (30–35 °С) и внести посевной материал, который приготовлен в опыте 1 в количестве 1,5 мл.

Колбу закрыть пробкой с газоотводной трубкой. Нижний конец трубки поместить в раствор баритовой воды.

Колбу с бродящей жидкостью поместить в водяную баню, в которой поддерживается температура 30–35 °С.

Наблюдать выделение  $\text{CO}_2$  и помутнение баритовой воды. Колбу с бродящей жидкостью закрыть ватными пробками и оставить в термостате при температуре 30–35 °С на трое суток для последующего определения спирта и наблюдений за накоплением гликогена в клетках.

Наблюдения за количеством гликогена проводят несколько раз: через 24, 48, 72 часа от начала брожения. Для этого каплю культуральной жидкости смешивают на предметном стекле с каплей раствора Люголя и рассматривают под микроскопом. Наличие в клетках бурых зернышек и капелек говорит о наличии гликогена, содержание которого сначала растет, а потом резко падает.

### **3. Анализ результатов брожения**

*Материалы и оборудование:* пробирки, пипетки, стеклянные палочки, спиртовка, колбы с бродящей жидкостью из опыта 2, прямые трубки длиной 40–50 см, лучинки.

*Реактивы:* 10 %-й раствор NaOH, бихромат калия  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , йод кристаллический, концентрированная серная кислота.

### *Ход работы*

5 мл жидкости пипеткой перенести в пробирку, добавить немного 10 %-го раствора NaOH и осторожно нагреть, не доводя до кипения. Добавить несколько кристаллов йода и снова нагреть. Жидкость окрашивается в желтый цвет и появляется запах йодоформа, что свидетельствует о наличии в среде этилового спирта (рис. 3).

К 5 мл испытуемой жидкости добавить кристаллик бихромата калия и несколько капель концентрированной серной кислоты. Смесь нагреть. Жидкость приобретает зеленый цвет вследствие восстановления хрома. Выделяющийся уксусный альдегид ощущается по запаху, что свидетельствует о присутствии спирта в среде.

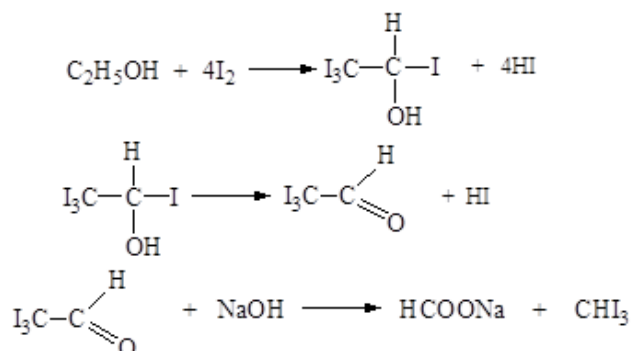


Рисунок 3 – Качественная реакция на спирты

Колбу с бродящей жидкостью закрыть пробкой с вертикальной стеклянной трубкой и осторожно нагреть до равномерного кипения. К концу стеклянной трубки поднести горящую лучинку. Выделяющиеся пары спирта воспламеняются. Над трубкой возникает факел, наблюдаемый в течение нескольких секунд.

### Лабораторная работа 13

#### Получение фосфоглицериновой кислоты в процессе сбраживания углеводов

Фосфоглицериновая кислота может быть получена в процессе сбраживания углеводов в присутствии толуола, фтористого натрия уксусного альдегида. В присутствии толуола процесс брожения задерживается на стадии гексозодифосфата, в результате устанавливающегося между фруктозодифосфатом и фосфотриозами равновесия, смещенного в сторону фруктозодифосфата; образующиеся в процессе распада гексозодифосфататриозофосфаты окисляются за счет добавленного уксусного альдегида в фосфоглицериновую кислоту, дальнейшее превращение которой исключается фторидом натрия: в присутствии фторида натрия не происходит превращения фосфоглицериновой кислоты в фосфопировиноградную. Фосфосфоглицериновую кислоту выделяют в виде бариевой соли.

*Материалы и оборудование:* весы, электрические плитки, центрифуга лабораторная, термостат, пробирки, пипетки, колбы объемом 50–500 мл, стаканы объемом 50 мл и 100 мл, воронки для фильтрования, бумажные фильтры, пипетки объемом 1 мл, 5 мл, 10 мл, груша или пипетатор, градуированные пробирки объемом 10 мл, цилиндры объемом 50 мл и 100 мл, ступки фарфоровые с пестиком, шпатели.

*Реактивы:* свежие пивные дрожжи нижнего брожения; глюкоза (может быть заменена тростниковым сахаром); фосфатный буферный раствор с рН = 7,0; 2,5 %-й раствор аммиака; магниезиальная смесь; толуол; 2 %-й раствор уксусного альдегида; 0,5 М раствор фторида натрия; насыщенный раствор ацетата магния; ледяная уксусная

кислота; 50 %-й раствор ацетата бария; 1 Н раствор соляной кислоты; 1 Н раствор гидроксида натрия (калия); спирт этиловый; 0,5 %-й спиртовой раствор фенолфталеина.

#### *Приготовление растворов*

1. Свежие пивные дрожжи нижнего брожения. Полученные с завода дрожжи промывают декантацией и отжимают руками или прессом (отжатую массу можно хранить несколько дней на холоде).

2. Фосфатный буферный раствор с  $pH = 7,0$ : 10,5 г  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  и 3,38 г  $KH_2PO_4$  на 150 мл воды.

3. Магнезиальная смесь: 100 г  $MgCl_2$  и 200 г  $NH_4Cl$  растворяют в 1 л воды и добавляют аммиак до сильного запаха.

#### *Ход работы*

Берут 40 г хорошо отмытых и отжатых свежих пивных дрожжей нижнего брожения, растирают их в ступке с 10 мл 10 %-го раствора глюкозы и помещают на 16–20 мин в термостат при  $37^\circ C$ . После этого содержимое ступки переносят в коническую колбу на 0,5 л, добавляют к густой дрожжевой каше 60 мл 40 %-го раствора глюкозы и 60 мл фосфатного буфера с  $pH = 7,0$ .

Содержимое колбы хорошо перемешивают, отбирают оттуда 1 мл для определения начального содержания неорганического фосфора и ставят колбу в термостат при  $37^\circ C$  на 30–40 мин. Время от времени из колбы отбирают пробы по 1 мл для определения неорганического фосфора, чтобы судить об интенсивности процесса фосфорилирования.

Определение неорганического фосфора проводится следующим образом: отобранную пробу (всегда 1 мл) выливают в 2 мл 2,5 %-го раствора аммиака, перемешивают и фильтруют. Из прозрачного фильтрата (или центрифугата) отбирают 1 мл и помещают его в одну из заранее заготовленных одинакового диаметра пробирок, содержащих по 1,5 мл раствора магнезиальной смеси. Перемешивают и оставляют стоять на 30 мин.

По объему выпавшего осадка фосфорнокислой аммонийно-магниевой соли судят о количестве оставшегося неорганического фосфора (пробирки с осадками сохраняют до конца брожения для сравнения между собой).

Через 30–40 мин инкубации к реакционной смеси добавляют 1 мл толуола и, если исчерпан весь фосфат, еще фосфатного буфера (30–40 мл). Всё хорошо перемешивают и оставляют в термостате на 3 ч, часто встряхивая в течение первого часа для лучшего насыщения жидкости толуолом.

В течение этого времени несколько раз отбирают пробы для определения неорганического фосфора, как указано выше. Как только этерификация неорганического фосфора закончится, дрожжи удаляют центрифугированием, а к центрифугату добавляют 60 мл 2 %-го раствора уксусного альдегида или 1 %-й раствор метиленовой сини и 5 мл 0,5 М раствора фторида натрия. Перемешивают и ставят на дальнейшую

инкубацию при 25–30°C на 10–15 ч. После этого раствор фильтруют и из фильтрата удаляют неорганический фосфат: к прозрачному фильтрату добавляют аммиак до щелочной реакции на фенолфталеин и насыщенный раствор ацетата магния до полноты осаждения. Фильтруют; фильтрат нейтрализуют ледяной уксусной кислотой и затем добавляют избыток ледяной уксусной кислоты (10–15 мл) и 30 мл 50 %-го раствора ацетата бария. Небольшой осадок отфильтровывают через фильтр для BaSO<sub>4</sub> и, тщательно потерев стенки стакана палочкой, оставляют на холоде на 20–30 ч. Если кристаллизация бариевой соли фосфоглицериновой кислоты не наступает, к жидкости добавляют равный объем этилового спирта. При этом выпадает аморфный осадок бариевой соли фосфоглицериновой кислоты. Осадок отсасывают и промывают холодной водой до тех пор, пока промывная жидкость не перестанет давать реакцию на сахар, а затем осадок промывают спиртом.

Бариевую соль фосфоглицериновой кислоты растворяют в 1 Н растворе соляной кислоты, фильтруют, если нужно, и затем, при тщательном помешивании, осторожно нейтрализуют 1 Н раствором щелочи до начала кристаллизации (раствор должен быть слабо кислым по конго). Для более полной кристаллизации оставляют на холоде до следующего дня. Кристаллический осадок отсасывают, промывают водой, спиртом и сушат на воздухе. Бариевая соль фосфоглицериновой кислоты кристаллизуется с двумя частицами воды, после однократной перекристаллизации обычно получают достаточно хороший препарат (чистота 95–97 %). Выход фосфоглицериновой кислоты сильно колеблется, что в значительной степени зависит от качества дрожжей.

## **Лабораторная работа 14**

### **Получение фруктозодифосфата**

Фруктозодифосфат может быть получен при сбраживании углеводов в присутствии толуола. Фруктозодифосфат выделяют в виде бариевой соли, которая в отличие от бариевых солей гексозомонофосфатов, трудно растворима в воде, особенно в горячей.

*Цель* – получение фруктозодифосфата и выделение его в виде бариевой соли.

*Материалы и оборудование:* весы, электрические плитки, центрифуга лабораторная, термостат, водяная баня, пробирки, пипетки, колбы объемом 50–2 000 мл, стаканы объемом 50 мл и 100 мл, воронки для фильтрования, пипетки объемом 1 мл, 5 мл, 10 мл, груша или пипетатор, бумажные фильтры, пробирки, стеклянные палочки, градуированные пробирки объемом 10 мл, цилиндры объемом 50 мл и 100 мл, ступки фарфоровые с пестиком, шпатели, воронка Бюхнера, насос Комовского, эксикатор.

*Реактивы:* тростниковый сахар, свежие отпрессованные пивные дрожжи нижнего брожения; толуол; гидрофосфат натрия Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; дигидрофосфат калия KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; аммиак концентрированный; магниезиальная смесь; 50 %-й раствор трихлоруксусной кислоты; уксуснокислый барий; 1 Н раствор соляной кислоты; 5 Н раствор едкого натрия; 10 %-й раствор сернокислого натрия; спирт; эфир; 0,5 %-й спиртовой раствор фенолфталеина; 0,5 %-й водный раствор метилового оранжевого.

### *Приготовление растворов*

1. Магнезиальная смесь (100 г  $MgCl_2$  и 200 г  $NH_4Cl$  растворяют в 1 л воды и добавляют раствор аммиака до сильного запаха).

#### *Ход работы*

В колбе на 2 л в 500 мл воды растворяют: 100 г тростникового сахара и 40 г фосфатной смеси, содержащей 30 г  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  и 10 г  $KH_2PO_4$ . Раствор нагревают до 40 °С и вносят туда 150 г пивных дрожжей первой или второй генерации, хорошо растертых в ступке в 100 мл воды. Смесь тщательно разбалтывают и, чтобы началось брожение, оставляют в термостате при 37 °С на 15–20 мин. Затем в смесь добавляют 20–25 мл толуола, хорошо перебалтывают и снова помещают в термостат. В начале инкубации необходимо время от времени тщательно перебалтывать реакционную смесь для насыщения раствора толуолом.

За ходом фосфорилирования следят по убыли неорганического фосфора, для чего каждые 30 мин из реакционной смеси отбирают по 1 мл раствора, выливают его в 2 мл 2,5 %-го раствора аммиака, перемешивают и фильтруют.

Из прозрачного фильтрата отбирают по 1 мл раствора и выливают в пробирки, содержащие по 1,5 мл раствора магнезиальной смеси. Перемешивают и оставляют на 30 мин. Пробирки, в которых производят осаждение неорганического фосфата магнезиальной смесью, должны быть одинакового диаметра. По объему осадка фосфорнокислой аммонийно-магниевой соли судят о количестве неорганического фосфора в растворе.

По мере инкубации происходит этерификация неорганического фосфора. Желательно брожение вести до полного исчезновения неорганического фосфора или до значительной его убыли. Как только достигнута полная этерификация неорганического фосфора или прекращается дальнейшая его убыль (о чем судят по объему осадка фосфорнокислой аммонийно-магниевой соли), брожение прекращают, добавляя 50 %-й раствор трихлоруксусной кислоты до конечной ее концентрации, равной 4 %. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на холоде на 30 мин, после чего осадок белков отсасывают на бюхнеровской воронке. К фильтрату добавляют 40 г ацетата бария, несколько (3–5) капель раствора фенолфталеина и 5 Н раствор едкого натра до слабо розового окрашивания ( $pH = 8,4$ ). В конце нейтрализации рекомендуется пользоваться разбавленным раствором едкого натра. В осадок выпадают бариевые соли фруктозо-дифосфата, неорганический фосфорнокислый барий, если фосфорилирование не дошло до конца, углекислый барий и частично бариевые соли гексозомонофосфатов.

Осадок отсасывают, промывают спиртом и сушат в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием.

Полученные с завода дрожжи промывают декантацией и отжимают руками или прессом. Отжатую массу можно хранить несколько дней на холоде. Можно оставить до следующего дня; ацетат бария добавляется в количестве, равном количеству взятых в опыт фосфорнокислых солей.



### Очистка фруктозодифосфата

*Получение дибариевой соли* ( $C_6H_{10}O_{12}P_2Ba_2$ ): 5 г сухого неочищенного препарата обливают 5 мл воды и 25 мл 1 Н раствора соляной кислоты, тщательно перемешивают, добавляют 10 %-й раствор сернокислого натрия до полноты осаждения ионов бария и фильтруют или центрифугируют.

Для удаления неорганического фосфата фильтрат нейтрализуют по метиловому оранжевому 5 Н раствором едкого натра, добавляют 2 мл 25 %-го раствора аммиака и 10 мл магниальной смеси.

Тщательно перемешивают, оставляют на 30–40 мин и фильтруют. К фильтрату добавляют 25 мл 1 Н раствора соляной кислоты и 10 мл 10 %-го раствора уксуснокислого бария для удаления избытка ионов  $SO_4^{2-}$ . Осадок сернокислого бария удаляют фильтрованием, к фильтрату добавляют 40 мл 10 %-го раствора уксуснокислого бария, несколько капель фенолфталеина и едкого натра до слабо розовой окраски. Прибавляют при помешивании  $\frac{2}{3}$  объема спирта, колбу нагревают на водяной бане до 60–70 °С и из горячего раствора осадок отсасывают на бюхнеровской воронке, промывают спиртом и сушат в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием.

Чистоту препарата определяют по количеству фосфора, отщепляющегося под влиянием фенилгидразина.

После однократной перекристаллизации обычно получается 12–15 г препарата 75–85 %-й чистоты.

*Получение монобариевой соли* ( $C_6H_{12}O_{12}P_2Ba$ ): 5 г неочищенного препарата растворяют в 40 мл холодного 0,1 Н раствора соляной кислоты, фильтруют, к фильтрату добавляют 4-кратный объем охлажденного спирта и перемешивают. Через 10 мин выпавшую в осадок монобариевую соль фруктозодифосфата отсасывают, промывают спиртом и сушат в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием.

### 3. Контрольные вопросы

1. Назовите основные отличия периодического и непрерывного культивирования.

2. Какие фазы размножения проходит биомасса клеток в условиях периодического культивирования?

3. Какие показатели используют для характеристики процессов роста популяции микроорганизмов?

4. В чем сущность метода определения углеродосодержащего субстрата в работе?

5. Какие условия необходимы для протекания каждого из видов брожения: спиртового, маслянокислого, молочнокислого, уксуснокислого? Назовите ферменты процессов брожения.

6. Какие микроорганизмы вызывают молочнокислое брожение? Чем отличается гомоферментативный процесс от гетероферментативного? Назовите культурные расы дрожжей, вызывающих спиртовое брожение.

7. В чем особенности жизнедеятельности чайного гриба?

8. Каким способом можно обнаружить молочную кислоту?

9. Как можно получить культуру маслянокислых бактерий? Каковы особенности бактерий рода *Clostridium*?

10. Какие качественные реакции существуют для обнаружения масляной кислоты в культуральной среде?

#### 4. Задания для самопроверки

1. Регулируемая ферментация в процессе биосинтеза достигается при способе:

- а) периодическом,
- б) непрерывном,
- в) отъемно-доливном,
- г) полупериодическом.

2. Вторичные метаболиты синтезируются (в большем количестве):

- а) в лаг-фазе,
- б) в фазе ускоренного роста,
- в) в логарифмической фазе,
- г) в фазе замедленного роста,
- д) в стационарной фазе.

3. Периодическое добавление субстрата приводит:

- а) к удлинению лаг-фазы,
- б) к удлинению фазы отмирания,
- в) к укорочению фазы отмирания,
- г) к удлинению экспоненциальной фазы.

4. При получении белковых продуктов биотехнологический процесс нужно остановить до перехода:

- а) в лаг-фазу,
- б) в экспоненциальную фазу,
- в) фазу отмирания,
- г) в стационарную фазу,
- д) фазу замедления.

5. Периодический процесс ферментации:

а) в ферментер одновременно загружают все компоненты питательной среды и посевной материал, совершается полный цикл ферментации и по завершении процесса собирают весь объем отработанной культуральной жидкости;

б) в процессе биосинтеза из ферментера непрерывно отбирают небольшие порции культуральной среды и одновременно в него вносят такой же объем питательной среды;

в) в процессе биосинтеза из ферментера непрерывно отбирают крупные порции культуральной среды и одновременно в него вносят такой же объем питательной среды;

г) по завершении ферментационного цикла при сливе культуральной жидкости в аппарате оставляют ее примерно на 10 %, с последующим внесением 90 % свежей питательной среды.

#### 6. Отъемно-доливной процесс ферментации:

а) по завершении ферментационного цикла при сливе культуральной жидкости в аппарате оставляют ее примерно на 10 %, с последующим внесением 90 % свежей питательной среды;

б) в процессе биосинтеза из ферментера непрерывно отбирают небольшие порции культуральной среды и одновременно в него вносят такой же объем питательной среды;

в) в ферментер одновременно загружают все компоненты питательной среды и посевной материал, совершается полный цикл ферментации и по завершении процесса собирают весь объем отработанной культуральной жидкости;

г) в процессе биосинтеза из ферментера непрерывно отбирают крупные порции культуральной среды и одновременно в него вносят такой же объем питательной среды.

#### 7. Первичные метаболиты:

а) сложные вещества, которые в водных растворах диссоциируют на катионы металлов и анионы кислотных остатков;

б) это продукты метаболизма, необходимые для роста и выживания;

в) группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы;

г) неорганические и органические, аморфные и кристаллические вещества, состоящие из мономерных звеньев.

8. Метод, когда питательный субстрат постоянно поступает в реактор через специальную мембрану и через нее же отводится часть культуральной жидкости без клеток:

а) периодическое культивирование в режиме диализа,

б) периодическое культивирование с подпиткой,

в) полунепрерывный отъемно-доливной метод,

г) метод полунепрерывной регулируемой ферментации.

9. Метод, при использовании которого возможно менять состав питательной среды в широком интервале значений концентраций различных компонентов, добиваясь при этом максимального выхода целевого продукта:

- а) глубинное культивирование,
- б) поверхностное культивирование,
- в) периодическое культивирование,
- г) непрерывное культивирование.

10. Lag-фаза это:

- а) фаза, когда адаптация закончилась, и клетки начинают интенсивно делиться;
- б) фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- в) фаза задержанного роста, при которой клетки растут медленно и адаптируются к новой среде обитания в объеме ферментера;
- г) фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих.

11. Log-фаза это:

- а) фаза, когда адаптация закончилась, и клетки начинают интенсивно делиться;
- б) фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- в) фаза задержанного роста, при которой клетки растут медленно и адаптируются к новой среде обитания в объеме ферментера;
- г) фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих.

12. Фаза замедленного роста это:

- а) фаза, когда адаптация закончилась, и клетки начинают интенсивно делиться;
- б) фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- в) фаза, связанная с истощением питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;
- г) фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих.

13. Фаза ускорения это:

- а) фаза, когда адаптация закончилась, и клетки начинают интенсивно делиться;
- б) фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- в) фаза, связанная с истощением питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма;
- г) фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих.

14. Фаза отмирания это:

- а) фаза, когда адаптация закончилась, и клетки начинают интенсивно делиться;
- б) фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- в) фаза, характеризующаяся прогрессирующей гибелью клеток;
- г) фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих.

15. Const-фаза это:

- а) фаза, когда адаптация закончилась, и клетки начинают интенсивно делиться;
- б) фаза, характеризующаяся интенсивным делением клеток и сбалансированностью роста всей популяции;
- в) фаза, характеризующаяся прогрессирующей гибелью клеток;
- г) фаза, при которой прирост новых клеток количественно равняется числу погибающих.

16. Принцип непрерывного проточного культивирования может реализовываться по схеме:

- а) процесс идеального (полного) вытеснения;
- б) процесс идеального (полного) смешения;
- в) верны оба варианта (а) и б));
- г) варианты а) и б) не верны.

17. Метод, когда в течение всего процесса периодического культивирования часть содержимого биореактора периодически изымается и добавляется равное количество свежей питательной среды:

- а) периодическое культивирование в режиме диализа;
- б) периодическое культивирование с подпиткой;
- в) полунепрерывный отъемно-доливной метод;
- г) полунепрерывной регулируемой ферментации.

18. Метод, при котором, помимо первичного внесения питательного субстрата до засева культуры, в процессе культивирования в аппарат через определенные интервалы добавляют небольшие объемы питательных веществ либо порциями, либо непрерывно по каплям:

- а) периодическое культивирование в режиме диализа;
- б) периодическое культивирование с подпиткой;
- в) полунепрерывный отъемно-доливной метод;
- г) метод полунепрерывной регулируемой ферментации.

19. Метод, когда добавляют отдельные компоненты питательной среды, поддерживая их концентрацию на постоянном благоприятном уровне – вначале для роста массы клеток, а затем – для синтеза целевого продукта:

- а) периодическое культивирование в режиме диализа;
- б) периодическое культивирование с подпиткой;
- в) полунепрерывный отъемно-доливной метод;
- г) метод полунепрерывной регулируемой ферментации.

20. Сопоставьте вид микроорганизма и основной продукт метаболизма.

Виды микроорганизмов:

Продукты метаболизма:

1) *Saccharomyces cerevisiae*,

а) масляная кислота,

2) *Lactobacillus bulgaricus*,

б) пропионовая кислота,

3) *Clostridium pasteurianum*,

в) молочная кислота,

4) *Propionibacterium freudenreichii*.

г) спирт.

21. Вторичные метаболиты – это:

а) низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре;

б) белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, ускоряющие (катализирующие) химические реакции в живых системах;

в) неорганические и органические, аморфные и кристаллические вещества, состоящие из «мономерных звеньев»;

г) группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы.

22. Сравните кривые роста микроорганизмов при получении первичных и вторичных метаболитов в биотехнологическом производстве.

23. В результате спиртового брожения глюкозы, содержащей 2 % несхаристых примесей, получили этанол, который окислили до кислоты. При действии избытка гидрокарбоната калия на полученную кислоту выделилось 8,96 л газа (н. у.). Какую массу глюкозы подвергли брожению?

24. Рассчитайте, сколько можно получить чистого метана при метановом сбраживании навоза на ферме, где содержится 500 голов крупного рогатого скота, если известно, что от одной коровы в год получают 20 т навоза. При метановом сбраживании 1 т навоза получают 45 м<sup>3</sup> биогаза, содержащего 65 % метана. Ответ выразите в м<sup>3</sup>/сут, данные округляйте до десятых.

## Раздел 4. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

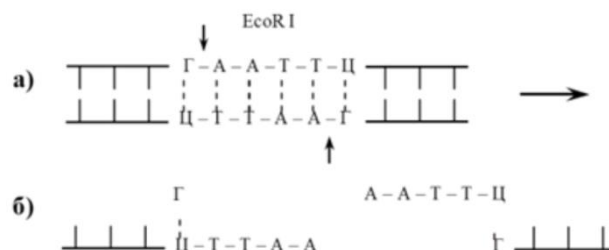
### 1. Ферменты и методы редактирования генома

Для того чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него новый ген или несколько генов от другого организма. Причем нужно, чтобы эти гены в чужом организме начали «работать» – производить белки.

Осуществляется эта процедура с помощью двух операций: «разрезания» и «сшивания». Роль портняжных инструментов играют ферменты рестриктазы и лигазы.

Рестриктазы (своеобразные молекулярные ножницы), действуя на двухцепочечную ДНК, «узнают» в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были распознаваемые участки. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом. Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4–6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с ровными (тупыми) концами, а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются «липкими», поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.

Ярким примером рестриктазы второго типа является *EcoR I*, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТТЦ, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А (рис. 4).



- а) схема действия фермента рестриктазы *EcoR I* на двухцепочечную молекулу ДНК с указанием участка распознавания и места разреза; б) фрагменты ДНК с липкими концами после разрезания

Рисунок 4 – Пример рестриктазы второго типа [11]

В результате место разреза в одной цепи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками.

Если с той же EcoR1 получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу «липкие концы». Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент – ДНК-лигаза. Он лигирует, то есть «сшивает» между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК. Внешне она ничем не отличается от обычной ДНК. Сейчас в арсенале генных инженеров имеется более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах. Несколько рестриктаз и участки ДНК, которые они могут разрезать, представлены в таблице 7.

С помощью этих и некоторых других ферментов многие исследователи начали конструировать и конструируют в настоящее время разнообразные по своим составным частям гибридные (рекомбинантные) ДНК.

Таблица 7 – Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности

Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК
Vam I	5`-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5`
EcoR I	5`-Г-А-А-Т-Т-Ц-3` 3`-Ц-Т-Т-А-А-Г-5`
Hind III	5`-А-А-Г-Ц-Т-Т-3` 3`-Т-Т-Ц-Г-А-А-5`
Hae III	5`-Г-Г-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Г-Г-5`
Hpa II	5`-Ц-Ц-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Ц-Ц-5`
Sma I	5`-Ц-Ц-Ц-Г-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Г-Ц-Ц-Ц-5`

В 2020 г. за разработку метода редактирования генома CRISPR/Cas американке Дженифер Дудна и французке Эммануэль Шарпантье была присуждена Нобелевская премия по химии. Возможность разрезать ДНК в строго определенных местах произвела революцию в науке (рис. 5).

Узнавание системой CRISPR/Cas осуществляется за счет комплементарного взаимодействия между некодирующей РНК и ДНК целевых сайтов. При этом образуется комплекс из некодирующих РНК и белков Cas, которые обладают нуклеазной активностью. Секвенирование бактериальных геномов позволило обнаружить в геноме многих микроорганизмов нуклеотидные последовательности, обладающие характерной структурой: короткие участки уникальной ДНК – спейсеры – отделены друг от друга



короткими палиндромными повторами. Благодаря этой особенности они и получили свое название – CRISPR (clustered regular lyinterspacedshort palindromic repeats, т.е. «кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы»).

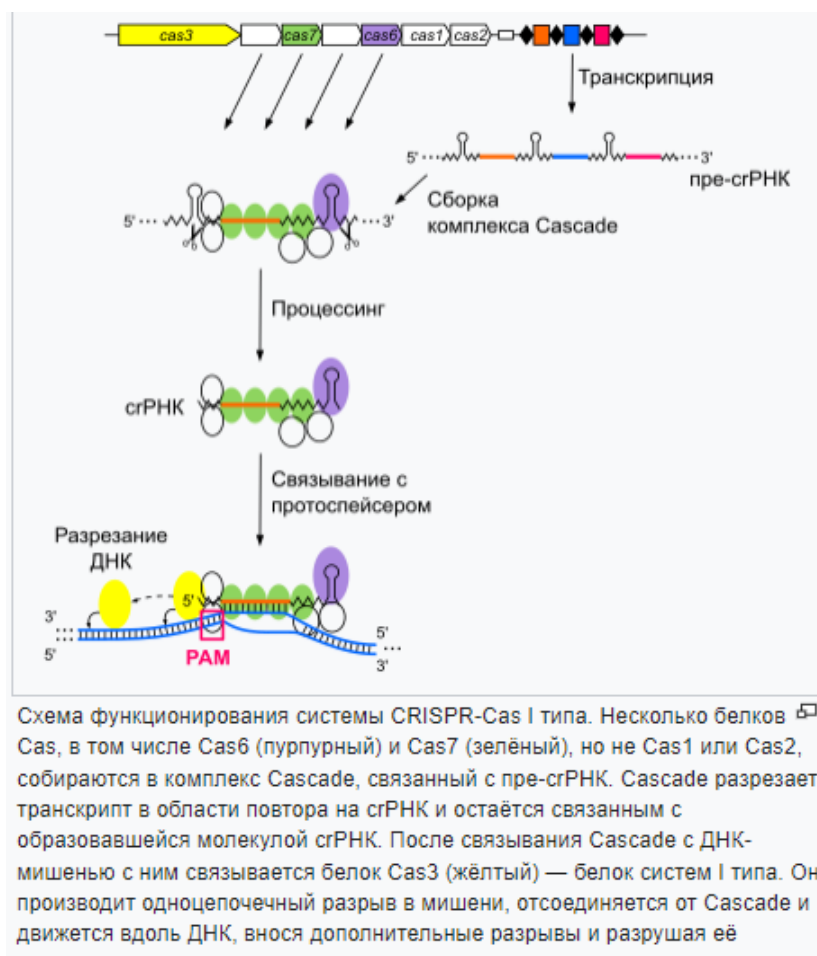


Рисунок 5 – Схема функционирования системы CRISPR-Cas I типа [8]

Кроме того, такие CRISPR-кассеты находятся в непосредственной близости от cas-генов (CRISPR-associated – ассоциированные с CRISPR), белковые продукты которых обладают хеликазной и нуклеазной активностью. В 2005 г. три независимые группы биоинформатиков сообщили о том, что спейсерная ДНК зачастую гомологична ДНК многих фагов и плазмид. А в 2007 г. было показано, что клетки *Streptococcus thermophilus*, несущие в локусе CRISPR спейсер, комплементарный участку геномной ДНК бактериофага, становятся устойчивыми к этому фагу. Таким образом, стало очевидным, что система CRISPR/Cas – это уникальный механизм, обеспечивающий защиту микроорганизмов от проникновения чужеродной ДНК и действующий, наряду с системой рестрикции-модификации, как ограничитель горизонтального переноса генетической информации.

Разработка системы CRISPR/Cas9 является важной ступенью в развитии современной геномной инженерии.

Использование системы CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ: ее значительно проще создать; обладает более высокой эффективностью и подходит для высокопроизводительного и мультиплексного редактирования генома в самых разных клеточных линиях и живых организмах. Для переориентации на новую мишень нужно только поменять 20-нуклеотидную направляющую последовательность sgRNA. Причем Cas9 вносит разрыв строго между 17-м и 18-м нуклеотидами в целевой последовательности (считая от 5'-конца спейсера), т.е. на расстоянии трех нуклеотидов от PAM. А одновременное редактирование нескольких генов значительно упрощается введением комбинации sgRNA [12].

Таким образом, использование библиотек CRISPR/Cas9 позволяет осуществлять функциональный скрининг геномов, который может дать важнейшие сведения о физиологии и биохимии клеток разного типа, поможет раскрыть молекулярные механизмы развития заболеваний и выявить потенциальные мишени для лекарственной и генной терапии.

Методы, основанные на использовании системы CRISPR/Cas9, могут эффективно применяться для редактирования геномов культивируемых стволовых клеток. В частности, применение систем редактирования геномов позволяет исправлять точечные мутации в клетках, полученных от больных.

## **2. Лабораторные работы по разделу 4**

### **Лабораторная работа 15**

#### **Выделение ДНК из ткани печени**

В клетках эукариотов ДНК содержится в виде соединения с белками – нуклеопротеида (ДНП). Поэтому метод выделения ДНК основан на способности ДНП растворяться в солевых растворах большой ионной силы и выпадать в осадок при снижении их концентрации [11].

*Цель* – выделить ДНП из клеток печени.

*Материалы и оборудование:* ступка с пестиком, мелкий песок, кристаллизатор, мерный цилиндр объемом 50 мл, деревянные палочки с насечками, водяная баня, марля для фильтрования.

*Реактивы:* 5 %-й раствор хлорида натрия, содержащий 0,04 % нитрата натрия, дистиллированная вода, печень свежая или мороженая.

*Ход работы*

2–3 г ткани печени тщательно разотрите в ступке с песком, постепенно приливая 35–40 мл раствора хлорида натрия.

Из двух слоев марли сделайте фильтр и пропустите через него полученный вязкий раствор в кристаллизатор.

Цилиндр отмерьте шестикратный (по отношению к фильтрату) объем дистиллированной воды и медленно добавьте ее в фильтрат.

Возьмите деревянную палочку и намотайте на нее образовавшиеся нити ДНП.

Сделайте вывод о том, почему стало возможным выделение ДНП.

## Лабораторная работа 16

### Выделение и свойства нуклеиновых кислот

*Цель* – выделить ДНП из дрожжевых клеток, гидролизовать полученный ДНП и провести качественный анализ продуктов гидролиза.

#### **Выделение нуклеопротеида из дрожжей**

*Материалы и оборудование:* весы электронные, пестик со ступкой, мерные цилиндры, центрифуга, химический стакан, мерная пробирка, пипетки.

*Реактивы:* дрожжи прессованные хлебопекарные, песок, диэтиловый эфир, дистиллированная вода, 0,4 %-й раствор гидроксида натрия, 10 %-й раствор уксусной кислоты.

#### *Ход работы*

Поместите 5 г дрожжей в ступку, добавьте к ним 1 мл диэтилового эфира и 2 мл воды. Прибавьте к смеси немного песка и при тщательном растирании приливайте небольшими порциями 20 мл 0,4 %-го раствора гидроксида натрия. Растирайте полученную смесь в течение 10 мин. Отделите осадок центрифугированием. Слейте надосадочную жидкость в стакан. Прилейте к ней 5–6 мл 10 %-го раствора уксусной кислоты.

**Вывод:** объясните необходимость использования песка для выделения нуклеопротеида. Предположите, какие процессы происходят при добавлении разбавленной щелочи к растертой массе дрожжей, центрифугировании, при добавлении уксусной кислоты к надосадочной жидкости.

#### **Гидролиз нуклеопротеида**

*Материалы и оборудование:* надосадочная жидкость, полученная в предыдущем опыте, 20 %-й раствор серной кислоты, круглодонная колба на 100 мл, бумажный складчатый фильтр, стеклянная воронка, обратный холодильник.

*Реактивы:* надосадочная жидкость, полученная в предыдущем опыте, 20 %-й раствор серной кислоты.

#### *Ход работы*

Перелейте надосадочную жидкость, полученную в предыдущем опыте в круглодонную колбу. Добавьте 10 мл 20 %-го раствора серной кислоты. Присоедините к колбе обратный холодильник и кипятите полученную смесь в течение двух часов. Затем охладите и отфильтруйте гидролизат через бумажный, складчатый фильтр. **Вывод:** Предположите, какие продукты образуются в результате гидролиза нуклеопротеида. Запишите уравнения химических реакций гидролиза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

#### **Обнаружение продуктов гидролиза нуклеопротеида**

*Материалы и оборудование:* пробирки, спиртовка, спички, пробиркодержатель.

*Реактивы:* гидролизат, полученный в предыдущем опыте, 30 %-й раствор гидроксида натрия, 5 %-й раствор сульфата меди, концентрированный раствор

аммиака, универсальная индикаторная бумага, аммиачный раствор нитрата серебра, фелингова жидкость, раствор молибдата аммония в азотной кислоте,

#### *Ход работы*

Прилейте к 1 мл гидролизата 4 мл 30 %-го гидроксида натрия и несколько капель 5 %-го раствора сульфата меди. Отметьте, какие происходят изменения. Какой продукт реакции гидролиза нуклеопротеида можно обнаружить данной качественной реакцией? Запишите уравнение химической реакции.

Прилейте по каплям к 2 мл гидролизата концентрированный раствор аммиака до щелочной среды. Прилейте равный объем аммиачного раствора нитрата серебра. Отметьте, какие происходят изменения. Какой продукт реакции гидролиза нуклеопротеида можно обнаружить таким методом? Запишите уравнение химической реакции.

Прилейте к 1 мл гидролизата 2 мл 30 %-го раствора гидроксида натрия. Добавьте 3 мл фелинговой жидкости и нагрейте смесь до кипения. Отметьте, какие происходят изменения. Какой продукт реакции гидролиза нуклеопротеида можно обнаружить таким способом? Запишите уравнение химической реакции.

Прилейте к 1 мл гидролизата 1 мл молибдата аммония в азотной кислоте. Нагрейте полученную смесь. Отметьте, какие происходят изменения. Какой продукт реакции гидролиза нуклеопротеида можно обнаружить таким способом? Запишите уравнение химической реакции.

### **3. Вопросы к конференции**

#### **Конференция по теме «Генная инженерия»**

1. Способы конструирования рекомбинантных ДНК. Ферменты, используемые при создании рекомбинантных ДНК.
2. Способы получения гена.
3. Перенос гена в клетки организма реципиента:
  - прямые методы переноса чужеродной генетической информации в клетки про- и эукариот;
  - векторные молекулы ДНК, требования, предъявляемые к векторам для клонирования;
  - плазмидные векторы;
  - векторы на основе бактериофагов;
  - гибридные векторы (космиды и фазмиды).
4. Идентификация клеток-реципиентов, несущих ген-мишень. Методы, основанные на идентификации признака, кодируемого геном.
5. Система полимеразной цепной реакции.
6. Получение иммуногенных препаратов и вакцин:
  - производство интерферонов;
  - производство вакцин на основе микробных клеток и их компонентов;

- производство вирусных вакцин (на примере вакцины против гриппа);
  - подходы к конструированию генно-инженерных вакцин;
  - вакцины первого, второго и третьего поколений;
  - создание безопасных вакцин против вируса гепатита В.
7. Генная инженерия микроорганизмов.
8. Генная инженерия в клетках растений.
- генно-инженерные работы в области биологической фиксации азота;
  - пути повышения эффективности фотосинтетических систем генно-инженерными методами;
  - выведение растений с увеличенным содержанием незаменимых аминокислот генно-инженерными методами;
  - выведение растений устойчивых к неблагоприятным внешним факторам (рН почвы, ранние заморозки, засолению и т.д.) генно-инженерными методами;
  - выведение растений устойчивых к гербицидам (глифосату) генно-инженерными методами.
9. Генная инженерия человека:
- основные направления и перспективы использования для терапии генетических заболеваний;
  - получение органов для трансплантации.
10. Генная инженерия в клетках млекопитающих и эмбрионах:
- трансгенные сельскохозяйственные животные;
  - принципиальные возможности генетической инженерии в животноводстве;
  - методы получения трансгенных животных;
  - генно-инженерные работы с геном гормона роста животных;
  - получение животных с ускоренным ростом и увеличенной массой;
  - главные направления генно-инженерных работ со структурными белками молока;
  - получение фармакологических белков в молоке трансгенных животных.
11. Получение инсулина, соматостатина, соматотропина методами генной инженерии.
12. Методы генной инженерии в медицинской диагностике, генной и белковой инженерии ферментов, получении бактерий для биodeградации токсикантов и ксенобиотиков, получении биоматериалов.

#### **4. Задания для самопроверки**

1. Понятие «липкие концы» применительно к генетической инженерии отражает:
- а) комплементарность нуклеотидных последовательностей,
  - б) взаимодействие нуклеиновых кислот и гистонов,
  - в) реагирование друг с другом SH-групп с образованием дисульфидных связей,
  - г) гидрофобное взаимодействие липидов.

2. Вектор на основе плазмиды предпочтительней вектора на основе фаговой ДНК благодаря:

- а) большому размеру,
- б) меньшей токсичности,
- в) большей частоты включения,
- г) отсутствия лизиса клетки хозяина.

3. Цель секвенирования генома – установление:

- а) размеров генома,
- б) последовательности нуклеотидов,
- в) содержания А-Т,
- г) соотношения А-Т/Г-Ц пар нуклеотидов,
- д) изменения метаболизма.

4. Плазмида – это:

- а) определенный штамм кишечной палочки, используемый для биотехнологических целей;
- б) кольцеобразная молекула ДНК – внехромосомный элемент генетической информации;
- в) участок цепи РНК, несущий информацию о структуре гена;
- г) вирус, размножающийся в цитоплазме микробной клетки;
- д) хромосома, используемая в качестве вектора для введения ДНК в клетки бактерий.

5. Отбор трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (гибридную плазмиду) проводят:

- а) тестированием на резистентность к различной температуре,
- б) тестированием на резистентность к определенным антибиотикам,
- в) по способности окрашиваться гематоксилином,
- г) по морфологическим признакам,
- д) по скорости роста и размножения.

6. Способы введения клонированных генов в соматические клетки:

- а) микроинъекции;
- б) с помощью химических реагентов, изменяющих проницаемость мембран;
- в) с помощью липосом, «теней» эритроцитов;
- г) экстракорпоральной обработкой хромосом бактериальной клетки;
- д) инфекцией клетки рекомбинантными вирусами.

7. Требования к векторам ДНК:
- а) отсутствие сайта рестрикции, в который осуществлена вставка;
  - б) большой размер;
  - в) видоспецифичность;
  - г) наличие селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.
8. Процесс изготовления генно-инженерных препаратов включает:
- а) копирование гена человека, ответственного за синтез необходимого продукта;
  - б) модификацию генетического аппарата больного для увеличения биосинтеза необходимых продуктов;
  - в) внедрение микробной клетки с рекомбинантной ДНК в организм человека;
  - г) культивирование и выделение микробных клеток с рекомбинантными ДНК;
  - д) внедрение человеческого гена в плазмиду микробной клетки.
9. Какой элемент оперона должен быть смещен для того, чтобы репрессия сменилась индукцией:
- а) РНК-полимераза,
  - б) промотор,
  - в) оператор,
  - г) белок-репрессор.
10. Кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передаче в геном реципиента чужеродных генов:
- а) цистрон,
  - б) промотор,
  - в) интрон,
  - г) плазида.
11. Процесс переноса генетической информации от клетки реципиента к клетке-донору с помощью фага называется:
- а) электропорация,
  - б) трансгеноз,
  - в) трансдукция,
  - г) редупликация.
12. Линкеры:
- а) несут сайты узнавания рестриктаз, формирующих «липкие концы»;
  - б) принимают участие в сплайсинге;
  - в) принимают участие в обратной транскрипции;
  - г) принимают участие в процессинге.

13. Ген-маркер необходим для:

- а) включения вектора в клетки хозяина;
- б) отбора колоний, образуемых клетками, в которые проникает вектор;
- в) для включения рабочего гена в вектор;
- г) для повышения стабильности вектора.

14. Сплайсинг – это:

- а) стадия после транскрипционного созревания РНК в ядре прокариот;
- б) стадия удаления неинформативных участков из предшественника РНК;
- в) стадия сращивания информативных участков «разорванных» м-РНК с помощью РНК-лигаз после вырезания неинформативных участков.

15. При получении генно-инженерного инсулина какие микроорганизмы используются в качестве продуцентов? Опишите этапы модификации клетки продуцента.

16. При получении генно-инженерного инсулина, основанного на раздельном биосинтезе 2 цепей, в качестве продуцента используют определенные микроорганизмы и модифицированный чужеродный ген (точнее, оперон) с лидерной последовательностью аминокислот (метионином и  $\beta$ -галактозидазой), отделяемой на последней стадии контакта секретируемого белка и клетки. Ферментацию проводят на среде с лактозой (или галактозой) для последующего объединения свободных инсулиновых цепей. Далее осуществляют выделение и очистку полученного инсулина.

На основе общей схемы получения инсулина и требований к его качеству проанализируйте и обоснуйте:

– условия выбора конкретного продуцента инсулина и конструкцию вектора, с помощью которого можно ввести в клетку чужеродный ген (ген инсулина);

– необходимость использования лидерной последовательности аминокислот с метионином и  $\beta$ -галактозидазой в синтезе инсулина и роль лактозы (галактозы) в процессе ферментации и получении завершенных инсулиновых цепей и их объединении;

– возможность проявления токсичности генно-инженерного инсулина. С чем это может быть связано, учитывая видоспецифичность данного инсулина, его серийное качество и уровень культуры производства на предприятии?

Прокомментируйте правила безопасности работы с микроорганизмами на генетическом и физическом уровнях.

17. В числе новых лекарственных средств можно рассматривать «антисмысловые олигонуклеотиды». Объясните цели их создания и механизм действия.

18. Технология рекомбинантных ДНК (генная инженерия) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой. Определите основные этапы клонирования рекомбинантной ДНК.



19. Приведенный ниже отрывок текста посвящен использованию метода редактирования генома CRISPR-Cas9. Выберите корректные по смыслу варианты из приведенных в скобках. В некоторых предложениях возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.

Метод редактирования генома, использующий систему CRISPR/Cas9, может быть использован для (*анализа родословной / исключения заранее выбранных генов / разработки штаммов бактерий, устойчивых к любым антибиотикам / создания новых видов животных / увеличения продуктивности экосистем*). Молекулярный процесс редактирования гена включает несколько стадий. На первой происходит связывание комплекса белка-нуклеазы Cas9 и направляющей РНК с (*антипараллельной / антисмысловой / идентичной / коллинеарной / комплементарной*) целевой областью ДНК. Далее (*белок / фермент / нуклеаза / рестриктаза / протеаза*) Cas9 осуществляет (*разрезание / расщепление / диссоциацию / стабилизацию / сопоставление*) нуклеотидной последовательности ДНК в области непосредственного взаимодействия РНК-ДНК с образованием двуцепочечного разрыва. На последнем этапе ферменты (*репарации / репликации / ретардации / лигирования / рестрикции*) ДНК восстанавливают образующийся разрыв с формированием мутаций в виде делеций или инсерций.

20. Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ3`

3`-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5`.

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК (табл. 8)?

Таблица 8 – Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности [11]

Рестриктаза	Участки распознавания и места разреза ДНК
Bam I	5`-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5`
EcoR I	5`-Г-А-А-Т-Т-Ц-3` 3`-Ц-Т-Т-А-А-Г-5`
Hind III	5`-А-А-Г-Ц-Т-Т-3` 3`-Т-Т-Ц-Г-А-А-5`
Hae III	5`-Г-Г-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Г-Г-5`
Hpa II	5`-Ц-Ц-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Ц-Ц-5`
Sma I	5`-Ц-Ц-Ц-Г-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Г-Ц-Ц-Ц-5`

21. Рестрикционный фермент Hind III разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? Какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

22. Гаплоидный геном человека содержит около  $3 \times 10^9$  нуклеотидных пар (н.п.) ДНК. Если вы разрежете человеческую ДНК рестрикционным ферментом EcoRI, узнающим гексамерную последовательность ГААТТЦ, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

23. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

- 1) 5'-АГЦАТАЦТГТГААТТЦАЦА-3'  
3'-ТГЦТАТГАЦАЦТТААГТГТ-5';
- 2) 5'-АТГААТТЦТТАГЦАТАЦ-3'  
3'-ТАЦТТААГААТЦГТАТГ-5'.

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

24. Для производства генно-инженерного инсулина используют рекомбинантные клетки *E. coli* с введенными плазмидами, позволяющими процессировать в клетках рекомбинантный белок в процессе их культивирования в ферментере. Рассчитать выход инсулина, зная, что молярная масса рекомбинантного белка равна 17 000 дальтон, аминокислотная последовательность инсулина в нем составляет около 6 000 Да, доля рекомбинантного белка в общей массе белков клетки равна 30 %, содержание белка в сырой клетке – обычно около 15 %, а концентрация клеток в ферментационной среде достигает 20 г/л.

25. Рассмотрите рисунок 6. Схема какого метода приведена на рисунке? К какому направлению биотехнологии относится данный метод? Как называется животное, обозначенное цифрой 3? У каких животных генотипы будут идентичны (укажите цифры)? Ответ поясните.

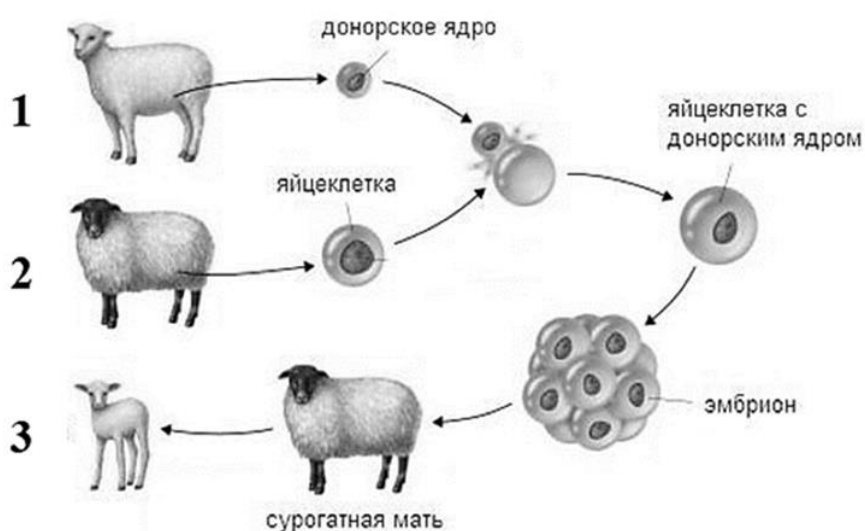


Рисунок 6 – Схема метода биотехнологии [7]

26. В настоящее время для лечения сахарного диабета широко применяется человеческий инсулин, впервые полученный в 1990-е годы. Какой метод биотехнологии использовали ученые для получения этого препарата? В чем суть этого метода? Какие операции необходимо выполнить для получения результата?

27. Рассмотрите рисунок 7. Как называется молекула, обозначенная цифрой 1? Какие ферменты используются для создания этой молекулы? Опишите процессы, осуществляемые данными ферментами.

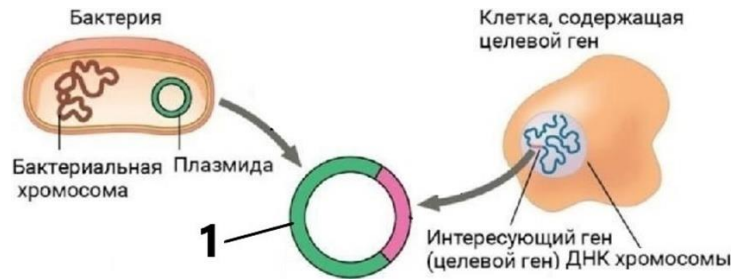


Рисунок 7 – Схема метода генной инженерии [8]

## **Раздел 5. МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

### **1. Основные понятия клеточной инженерии**

Клеточная инженерия – это создание клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. Основной задачей клеточной инженерии является конструирование новых форм растений с желаемыми признаками. Клеточная инженерия используется для решения теоретических проблем в биотехнологии и является одним из ее основных методов для создания новых форм растений. Метод основан на реконструкции жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов с разным генотипом либо существенном преобразовании исходного генотипа. Перспективен метод получения дальнеродственных гибридов на основе парасексуальной гибридизации путем слияния протопластов.

Реконструкция клетки является бурно развивающимся направлением клеточной инженерии. Речь идет о сборке совершенно новой клетки за счет объединения (слияния) изолированных клеточных фрагментов друг с другом или с целыми клетками. В результате такой реконструкции можно создать клетку, ранее в природе не существовавшую. Однако многие проблемы, стоящие на пути исследований в данном направлении, связаны с ограниченным числом подходящих методик фрагментации и выделения гомогенных популяций интактных клеточных фрагментов.

Одним из этапов клеточно-инженерного процесса является получение каллусной ткани у разных растительных объектов.

Каллус – определенным образом организованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток. Образование и рост каллусной ткани контролируется фитогормонами типа ауксинов и цитокининов. Под действием ауксинов происходит дедифференцировка, а под влиянием цитокининов – интенсивное деление, в результате которого образуется ткань.

Спонтанное образование каллусной ткани в природе мы можем наблюдать на месте повреждения. Каллусные клетки затягивают рану, а впоследствии дифференцируются в утраченные ткани растения. Например, когда вы черенкуете розы или другие древесные растения, то на месте нижнего среза, погруженного в воду вырастает мозолеобразное образование – каллус, из которого затем формируются корни, происходит укоренение черенка. Очень часто каллус формируется на поврежденных корнеплодах моркови (особенно в месте среза листьев), на черешках кочанов капусты.

Каллусную ткань также можно получить на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, используя фрагменты самых разных частей растения: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей, семядолей и т.д. Такие фрагменты называются эксплантами [5].

## 2. Лабораторные работы по разделу 5

### Лабораторная работа 17

#### Получение каллусной ткани из листьев табака

*Цель* – получение каллусной ткани из листьев табака.

Табак – классический объект для получения каллусной ткани и дальнейших ее исследований. Клетки табака легко дедифференцируются и переходят к делению, образуя быстро растущую каллусную ткань. Кроме того, в каллусной ткани табака легко вызвать регенерацию. Каллусообразование очень хорошо идет у основания листьев табака, особенно в зоне, примыкающей к срединной жилке. Для получения каллуса пригодны как стерильные, так и нестерильные растения. Нестерильные растения стерилизуют в растворе хлорамина, перекиси водорода или других стерилизующих агентов.

*Материалы и оборудование:* термостат, пробирки со стерильной водой (3 штуки), скальпель, пинцет, спиртовка, кафельная плитка, стаканчик, подставки для инструмента, кисточка, чашка Петри, спички, пробирки со средой МС с добавлением гормонов: 2 мг 2,4-Д и 0,2 мг кинетина на литр среды.

*Реактивы:* растения табака любого возраста, стерильные или нестерильные, раствор этанола, 4 %-й раствор хлорамина.

#### *Ход работы*

Листья табака промыть в мыльном растворе, отмыть от мыла водопроводной водой, ополоснуть дистиллированной. Погрузить на 1 мин в стаканчик с этанолом, вынуть, после чего поместить в чашку Петри и залить стерилизующим раствором на 10 мин. Раствор слить, промыть трижды стерильной дистиллированной водой из пробирок (в каждой из порций держать не менее 5 мин). Если берутся пробирочные растения, то предварительная стерилизация не требуется. Стерильные листья табака положить на предварительно обожженную кафельную плитку, стерильным скальпелем вырезать фрагменты у основания листьев, прилегающие к средней жилке, длиной 1–1,5 см, шириной 1 см. Перенести подготовленные участки листьев в пробирки или чашки Петри с питательной средой МС, содержащей гормоны, поместить в термостат при температуре 26 °С. Через 3 недели рассмотреть и зарисовать результат.

### Лабораторная работа 18

#### Получение и культивирование каллуса из стебля картофеля

Культуру изолированных апикальных меристем используют для получения свободного от вирусов посадочного материала и для микроклонального размножения растений. Апикальная меристема обычно свободна от вирусов, она представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм и шириной 0,25 мм. Поскольку меристеме бывает трудно изолировать без повреждения, ее часто отделяют с 1–2 листовыми зачатками. Для повышения эффективности оздоровления картофеля метод верхушечной меристемы сочетают с термо- и химиотерапией. Безвирусные растения размножают *in vitro* и высаживают в теплицы для получения безвирусных клубней.

*Цель* – получение и культивирование каллуса из стебля картофеля.

*Посуда:* пробирки со стерильной водой (3 штуки), скальпель, пинцет, спиртовка, кафельная плитка, стаканчик, подставки для инструмента, кисточка, стерильная чашка Петри, спички, чашки Петри или колбы со средой МС (с добавлением гормонов – 4 мг 2,4-Д и 0,2 мг кинетина на литр среды).

*Реактивы:* стерильные растения картофеля в пробирке или нестерильные проростки клубней картофеля, длиной 10–15 см; раствор этанола; 4 %-й раствор хлорамина.

В ответ на поранение паренхимные клетки, помещенные в питательную среду, содержащую фитогормоны, дедифференцируются, переходят к делению и образуют каллус. У картофеля каллус может быть получен из тканей стебля, листа, клубня, пыльника.

*Ход работы*

Если используется стерильное растение из пробирки, то горлышко пробирки обжечь спиртом. Пинцетом вынуть стерильное растение из пробирки и поместить его в стерильную чашку Петри. Если берется нестерильное растение, то после промывки его оставляют в чашке Петри. Придерживая крышку в полуоткрытом состоянии, стерильным скальпелем вырезать участки стебля длиной 5–10 мм, не захватывая междоузлия. Обжечь инструменты, перенести вырезанный участок на плитку, надсечь экспланты в нескольких местах для появления в дальнейшем раневого каллуса. Поместить их в колбу или чашку Петри со стерильной средой, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В одну чашку Петри помещают 5–10 эксплантов. Закрывают колбу или чашку Петри. Чашки Петри клеить парафином или пищевой пленкой. Поместить в термостат без освещения и выдержать 3 недели при температуре 22–25 °С. Через 3 недели рассмотреть и зарисовать образовавшийся каллус.

## **Лабораторная работа 19**

### **Получение и культивирование каллусной ткани из зародышей пшеницы**

Каллусную ткань, полученную из зародышей пшеницы, используют для исследований по клеточной селекции на солеустойчивость, засухоустойчивость, устойчивость к другим неблагоприятным факторам абиотической и биотической природы. Она может быть использована для получения суспензионной культуры, изолированных протопластов, растений регенерантов, а также для количественного и качественного исследования вторичных метаболитов.

*Цель* – получение и культивирование каллусной ткани из зародышей пшеницы.

*Материалы и оборудование:* термостат, чашка Петри, стерильный пинцет, скальпель, кисточка, стакан, кафельная плитка, колба со стерильной водой, спиртовка, спички.

*Реактивы:* зрелые зерновки пшеницы, пробирки со стерильной средой Гамборга с добавлением 5 мг/л 2,4-Д, раствор этанола, 4 %-й раствор хлорамина.

Каллусы, полученные из зародышей пшеницы, используют для селекции растений на солеустойчивость, засухоустойчивость, устойчивость к другим неблагоприятным факторам.

#### *Ход работы*

Семена пшеницы промыть водой с мылом, затем водопроводной водой, ополоснуть дистиллированной водой. Поместить их в чашку Петри, залить этанолом на 5 мин, этанол слить в стаканчик, залить хлорамином на 15 мин, трижды промыть стерильной дистиллированной водой, выдерживая по 5 мин в каждой смене. Зерновку пинцетом поместить на плитку, вычленить зародыш, разрезать его поперек на 2 части. Верхнюю половинку зародыша, обращенную в зерновке к центру, поместить срезом на поверхность питательной среды в пробирке. Поместить в термостат при температуре 25 °С. Через три недели рассмотреть, зарисовать результаты.

### **3. Вопросы к конференции**

#### **Вопросы к конференции «Клеточная инженерия»**

1. Каллусогенез и дедифференцировка клеток.
2. Получение и культивирование протопластов.
3. Слияние протопластов.
4. Гибридная технология.
5. Клеточные ассоциации клеток высших растений и микроорганизмов:
  - введение микроорганизмов в изолированные протопласты растений,
  - введение микроорганизмов в популяции культивируемых клеток растений,
  - цианобактерии в клеточных ассоциациях.
6. Получение моноклональных антител:
  - слияние,
  - клонирование гибридных клеток,
  - замораживание и оттаивание гибридных клеток,
  - методы выявления антител, синтезируемых гибридными клетками,
  - массовая наработка моноклональных антител,
  - очистка антител,
  - моноклональные антитела человека.

### **4. Задания для самопроверки**

1. Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:
  - а) половой совместимостью,
  - б) половой несовместимостью,
  - в) совместимость не имеет существенного значения.

2. Преимущество растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток перед сырьем, получаемым из плантационных или дикорастущих растений:

- а) большая концентрация целевого продукта,
- б) меньшая стоимость,
- в) стандартность,
- г) более простое извлечение целевого продукта.

3. Процесс переноса генетической информации от клетки реципиента к клетке-донору с помощью фага называется:

- а) электропорация,
- б) трансгеноз,
- в) трансдукция,
- г) редупликация.

4. Способность растения функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки называется:

- а) тотипотентность,
- б) синергизм,
- в) редупликация,
- г) пролиферация.

5. Какие клетки наиболее пригодны для получения протопластов:

- а) эмбриональные клетки,
- б) клетки перед самым делением,
- в) находящиеся в логарифмической стадии,
- г) клетки во время стационарной фазы.

6. Как называются недифференцированные клетки, являющиеся тотипотентными и способными поэтому дать начало целому растению:

- а) инокулюм,
- б) нуцеллус,
- в) соматклоны,
- г) каллус.

7. В биотехнологии гибридомы – это:

- а) генетически однородное потомство одной клетки;
- б) клоновая культура, наследственная однородность которой поддерживается;
- в) клеточные линии, полученные от слияния нормальных лимфоцитов и миеломных клеток;
- г) отбором по специфическим признакам;
- д) клетки, лишенные клеточной оболочки.



8. Проведите сравнительную характеристику каллусных и суспензионных культур при использовании их в качестве субстрата для получения БАВ биотехнологическими методами.

9. В промышленных условиях используется метод непрерывного глубинного культивирования в ферментерах различной конструкции, которые учитывают специфику растительных клеток. Укажите ряд преимуществ глубинного культивирования в биореакторах.

10. Рассмотрите рисунок 8. Какие методы (приемы) применяются в данном эксперименте? К какому направлению биотехнологии относятся эти методы? Каково их значение в сельском хозяйстве, медицине, сохранении биоразнообразия?

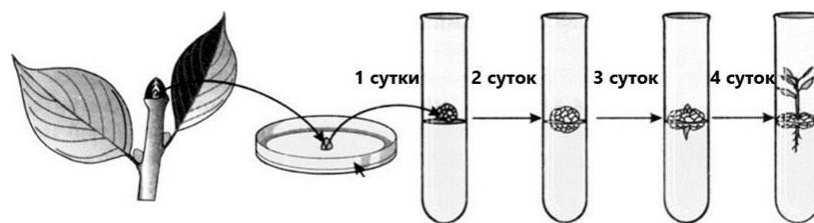


Рисунок 8 – Схема метода

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В век пятой научно-технической революции, важной ценностью которой является умение работать с информацией, прогрессивной и динамично развивающейся отраслью человеческой деятельности становятся биотехнологии.

Сегодня биотехнология – это интегральная наука, определяющая научно-технический прогресс. Это единственная дисциплина, объединяющая фундаментальную и прикладную науку, а также производство. Развитие и широкое использование современных биотехнологий в медицине, пищевой, фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и других отраслях экономики является определяющим для устойчивого социально-экономического развития страны, повышения качества жизни населения. Важнейшим фактором успешного развития отечественной биотехнологии является дальнейшее совершенствование системы биотехнологического образования.

В настоящем учебном пособии представлены материалы для организации и проведения аудиторных занятий, а также самостоятельной работы по дисциплине «Биотехнология».

По всем основным разделам дисциплины: микробиологический синтез, применение иммобилизованных ферментов, генная инженерия, клеточная инженерия – приведены примеры лабораторных работ, которые могут быть выполнены в том числе в школьной лаборатории и использованы при организации исследовательской деятельности обучающихся.

Для самостоятельной работы студентов предлагаются тесты и задачи разного уровня сложности.

Задачи и тесты, предложенные для выполнения в ходе занятий и подготовки к ним, позволяют активизировать самостоятельную работу студентов бакалавриата для более качественного осмысления материала и развития профессиональных качеств будущих учителей биологии и химии.

Авторы будут благодарны читателям за замечания и предложения по улучшению содержания учебного пособия и формы изложения материала.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### Основная литература

1. Смятская, Ю.А. Современная биотехнология: учебное пособие для вузов / Ю.А. Смятская, А. Туми. – Санкт-Петербург: Троицкий мост, 2024. – 156 с. – ISBN 978-5-6049611-3-1. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/136768.html> (дата обращения: 22.02.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

2. Чхенкели, В.А. Биотехнология: учебное пособие / В.А. Чхенкели. – Санкт-Петербург: Проспект Науки, 2024. – 335 с. – ISBN 978-5-906109-06-4. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/80077.html> (дата обращения: 14.06.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

### Дополнительная литература

3. Адамов, Э.В. Биотехнология металлов: курс лекций / Э.В. Адамов, В.В. Панин. – Москва: Издательский Дом МИСиС, 2003. – 147 с. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/56040.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

4. Введение в направление. Биотехнология: учебное пособие для студентов вузов / Л.С. Дышлок [и др.]. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2014. – 157 с. – ISBN 978-5-89289-810-2. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/61262.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

5. Долгих, С.Г. Учебное пособие по генной инженерии в биотехнологии растений: учебное пособие / С.Г. Долгих. – Алматы: Нур-Принт, 2014. – 141 с. – ISBN 978-601-278-045-1. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/67169.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

6. Кузнецов, И.Н. Технология микробного синтеза антибиотиков, витаминов и ферментов. Лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1–48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1–48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов» / И.Н. Кузнецов. – Минск: БГТУ, 2018. – 88 с. – ISBN 978-985-530-668-0.

7. Микробиология с основами биотехнологии (теория и практика): учебное пособие / Г.П. Шуваева [и др.]. – Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2017. – 316 с. – ISBN 978-5-00032-239-0. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/70810.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей

8. Основы биотехнологии: учебное пособие / А.Ю. Просеков [и др.]. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2015. – 214 с. – ISBN 978-5-89289-911-6. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/61271.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

9. Тихонов, Г.П. Основы биотехнологии: методические рекомендации для самостоятельной подготовки студентов / Г.П. Тихонов, И.А. Минаева. – Москва: Московская государственная академия водного транспорта, 2009. – 137 с. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/46298.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

10. Цымбаленко, Н.В. Биотехнология. Часть 1. Технология рекомбинантной ДНК: учебное пособие (для студентов биологических специальностей педагогических университетов) / Н.В. Цымбаленко. – Санкт-Петербург: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2011. – 128 с. – ISBN 978-5-8064-1697-2. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/20549.html> (дата обращения: 30.09.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

11. Якупов, Т.Р. Молекулярная биотехнология / Т.Р. Якупов, Т.Х. Фаизов. – Казань: Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2018. – 279 с. – Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. – URL: <https://www.iprbookshop.ru/104846.html> (дата обращения: 27.03.2024). – Режим доступа: для авторизир. пользователей.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Адамцевич, Н.Ю. Технология продуктов брожения. Лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие для студентов специальности 7-07-0711-02 «Промышленная биотехнология» / Н.Ю. Адамцевич, Д.С. Сергиевич, Т.М. Тананайко. – Минск: БГТУ, 2024. – 80 с. – ISBN 978-985-897-159-5.

2. Биотехнология: теория и практика: учеб. пособие для вузов / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – Москва: Оникс, 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173-0.

3. Биотехнология: учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 7: Иммуобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов [и др.]. – Москва: Высшая школа, 1987. – 159 с.

4. Биохимия: практикум: учеб.-метод. пособие / Г.Г. Борисова, Н.В. Чукина [и др.]; под общ. ред. Г.Г. Борисовой; Министерство образования и науки РФ, Уральский федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 116 с.

5. Князьков, И.Е. Клеточная инженерия растений: учебное пособие / И.Е. Князьков, О.Н. Сахно; Министерство образования и науки РФ; Владимирский гос. ун-т. – Владимир: Аркаим, 2016. – 84 с.

6. Кузнецов, И.Н. Технология микробного синтеза антибиотиков, витаминов и ферментов. Лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1–48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1–48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов» / И.Н. Кузнецов. – Минск: БГТУ, 2018. – 88 с.

7. Многопрофильная инженерная олимпиада «Звезда» «Биотехнологии» // Olimpiada.ru: [сайт]. – URL: <https://tasks.olimpiada.ru/upload/files/tasks/5663/2023/5663-tasks-tit-11-bt-final-23-24.pdf> (дата обращения: 18.04.2024).

8. О заданиях Олимпиады НТО: Геномное редактирование (НТИ) // Поступи онлайн: [сайт]. – URL: <https://postupi.online/olimpiada/olimpiada-nti-nto-genomnoe-redaktirovanie/zadaniya/> (дата обращения: 15.04.2024).

9. Основы биотехнологии / авт.-сост. Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин, Е.И. Игнатенко, Ю.В. Селезнева. – Минск: БГУ, 2009. – 48 с.

10. Польшгалына, Г.В. Определение активности ферментов / Г.В. Польшгалына, В.С. Чередныченкo, Л.В. Рымарева // Справочник. – Москва: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.

11. Практикум по генетической инженерии и молекулярной биологии растений / Е.С. Гвоздева, Е.В. Дейнеко, А.А. Загорская [др.]. – Томск: Томский государственный университет, 2012. – 96 с.

12. Слуцкая, Т.Н. Теоретические основы и научные проблемы современных биотехнологий обработки водных биологических ресурсов: методические указания по выполнению лабораторных работ и организации самостоятельной работы аспирантов направления 19.06.01 «Промышленная экология и биотехнология» / Т.Н. Слуцкая, С.Н. Максимова, Е.В. Суровцева; Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет. – Владивосток: Изд-во Дальрыбвтуз, 2017. – 31 с.

13. Типы брожения. Качественные реакции спиртового, молочнокислого, маслянокислого брожения: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 18 с.

14. Яковлева, Г.Е. Ферменты в клинической биохимии / Г.Е. Яковлева. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2005. – 44 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Раздел 1. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	4
1. Методы определения ферментативной активности	5
2. Способы определения концентрации продукта реакции или субстрата	7
3. Лабораторные работы по разделу 1	14
Лабораторная работа 1. Получение ферментного препарата и определение глюкоамилазной активности	14
Лабораторная работа 2. Определение активности липазы по модифицированному методу Ота – Ямада	17
Лабораторная работа 3. Определение амилалитической активности (АС)	18
Лабораторная работа 4. Количественное определение протеолитической активности желудочного сока по Ансону	21
4. Контрольные вопросы	21
5. Задания для самопроверки	22
Раздел 2. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК В БИОТЕХНОЛОГИИ	28
1. Иммобилизация ферментов	28
2. Лабораторные работы по разделу 2	30
Лабораторная работа 5. Иммобилизация биокатализаторов включением в гели. Включение клеток дрожжей в гели агар	30
Лабораторная работа 6. Изучение влияния ионов кальция на активность иммобилизованного препарата глюкоамилазы	32
3. Вопросы к конференции	35
4. Задания для самопроверки	37
Раздел 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НА ОСНОВЕ ПРОЦЕССА БРОЖЕНИЯ	39
1. Биохимические основы процесса брожения	39
2. Лабораторные работы по разделу 3	40
Лабораторная работа 7. Виды брожений. Молочнокислое брожение	40
Лабораторная работа 8. Виды брожений. Спиртовое брожение	44

Лабораторная работа 9. Виды брожений. Уксуснокислое брожение	45
Лабораторная работа 10. Виды брожений. Маслянокислое брожение	46
Лабораторная работа 11. Спиртовое брожение как модель биотехнологического производства	48
Лабораторная работа 12. Микробиологический синтез на примере спиртового брожения (школьный вариант)	50
Лабораторная работа 13. Получение фосфоглицериновой кислоты в процессе сбраживания углеводов	52
Лабораторная работа 14. Получение фруктозодифосфата	54
3. Контрольные вопросы	56
4. Задания для самопроверки	57
<b>Раздел 4. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ</b>	<b>62</b>
1. Ферменты и методы редактирования генома	62
2. Лабораторные работы по разделу 4	65
Лабораторная работа 15. Выделение ДНК из ткани печени	65
Лабораторная работа 16. Выделение и свойства нуклеиновых кислот	66
3. Вопросы к конференции	67
4. Задания для самопроверки	68
<b>Раздел 5. МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ</b>	<b>75</b>
1. Основные понятия клеточной инженерии	75
2. Лабораторные работы по разделу 5	76
Лабораторная работа 17. Получение каллусной ткани из листьев табака	76
Лабораторная работа 18. Получение и культивирование каллуса из стебля картофеля	76
Лабораторная работа 19. Получение и культивирование каллусной ткани из зародышей пшеницы	77
3. Вопросы к конференции	78
4. Задания для самопроверки	78
Заключение	81
Рекомендуемая литература	82
Библиографический список	84



Учебное издание

Наталья Михайловна Лисун  
Андрей Александрович Сутягин

## **ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

Учебно-практическое пособие

**ISBN 978-5-907869-59-2**

Работа рекомендована РИС ЮУрГГПУ  
Протокол № 31, пункт 16 от 2024 г.

Редактор О.В. Боярская  
Технический редактор О.М. Нежиренко

Издательство ЮУрГГПУ  
454080, г. Челябинск, пр. Ленина, 69

---

Подписано в печать 21.11.2024.

Объем 4,5 уч.-изд. л. (10,4 усл. п. л.)

Тираж 100 экз.

Бумага офсетная

Формат 60x84/8

Заказ № \_\_\_\_\_

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии ЮУрГГПУ  
454080, г. Челябинск, пр. Ленина, 69