

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»**

С. В. АГАФОНОВА

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие по лабораторным работам
для студентов бакалавриата, обучающихся
по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология»
(профиль подготовки – «Пищевая биотехнология»)



Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2021

РЕЦЕНЗЕНТ:

профессор, д-р техн. наук, зав. кафедрой пищевой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»

О. Я. Мезенова

Агафонова, С. В.

Основы биотехнологии: учебно-методическое пособие по лабораторным работам для студентов бакалавриата, обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 – Биотехнология (профиль «Пищевая биотехнология») по дисциплине «Основы биотехнологии» / С. В. Агафонова. – Калининград: ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», 2021. – 108 с.

Учебно-методическое пособие содержит методические указания по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Основы биотехнологии». Лабораторные работы посвящены изучению биотехнологических объектов, методов их культивирования; принципов расчета и приготовления питательных сред для ферментации; методов выделения, очистки и концентрирования биотехнологических продуктов; методов иммобилизации ферментных препаратов и принципов их использования в пищевой промышленности; методов оценки токсичности среды с помощью биообъектов.

Учебно-методическое пособие рекомендуется к использованию для студентов высших учебных заведений направления 19.03.01 «Биотехнология» (профиль «Пищевая биотехнология») и может быть использовано студентами, обучающимися по образовательным программам в области пищевых технологий и биотехнологии

Табл. 6, рис. 19, список лит. – 17 наименований.

УДК 60

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2021 г.
© Агафонова С. В., 2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
<i>Лабораторная работа № 1</i> Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> как биотехнологический объект. Количественный учет клеток с помощью счетной камеры	6
<i>Лабораторная работа № 2</i> Периодическое культивирование дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в лабораторном ферментере	17
<i>Лабораторная работа № 3</i> Получение каллусной ткани растений и ее суспензионное культивирование	35
<i>Лабораторная работа № 4</i> Изучение метода разделения окрашенных жидкостей с помощью эксклюзионной хроматографии	49
<i>Лабораторная работа № 5</i> Получение дрожжевого автолизата.....	58
<i>Лабораторная работа № 6</i> Изучение методов выделения, определения активности и иммобилизации ферментов.....	69
<i>Лабораторная работа № 7</i> Определение концентрации нуклеиновых кислот в биологическом материале	79
<i>Лабораторная работа № 8</i> Определение токсичности сред с помощью биоиндикации	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99
ПРИЛОЖЕНИЯ	101

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов бакалавриата по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология» (профиль «Пищевая биотехнология»), выполняющих лабораторные работы по дисциплине «Основы биотехнологии». Знания, приобретенные по данной дисциплине, являются базовыми при подготовке биотехнологов, ориентированных на профессиональную деятельность в пищевой промышленности.

В результате освоения знаний по представленному разделу дисциплины обучающийся должен:

- освоить основные принципы и методы работы с биотехнологическими объектами; методы и принципы приготовления питательных сред для ферментации; способы выделения, очистки и концентрирования биотехнологических продуктов;

- приобрести навыки ведения биотехнологического процесса ферментации, получения готовых форм биотехнологических продуктов;

- сформировать базовые знания, умения и навыки для успешного освоения основных биотехнологических процессов.

Представленные лабораторные работы являются важной частью дисциплины «Основы биотехнологии». Их выполнение позволит обучающимся приобрести необходимые знания и навыки для практической деятельности при ведении биотехнологических процессов.

Результатами освоения дисциплины «Основы биотехнологии» должны быть следующие профессиональные компетенции:

- владение основными методами и приемами проведения экспериментальных исследований в своей профессиональной области; способность проводить стандартные и сертификационные испытания сырья, готовой продукции и технологических процессов (ПК);

- способность изучать, анализировать, использовать биологические объекты и процессы, основываясь на математических, общетехнических, физиче-

ских, химических, биологических законах, закономерностях и взаимосвязях (ПКД).

Отчеты о выполнении лабораторных работ формируются студентами в рабочей тетради. Отчет должен включать:

- название лабораторной работы;
- цель;
- порядок действий при проведении каждого опыта (ход работы), формулы для расчета;
- некоторые схемы и определения из справочных материалов (по указанию преподавателя);
- таблицы и рисунки с полученными в ходе лабораторной работы данными;
- вывод по лабораторной работе.

Преподаватель проверяет усвоение студентами теоретического материала, знание методов анализа, оценивает уровень оформления работы и при его соответствии подписывает отчет. Лабораторные работы должны выполняться с соблюдением требований техники безопасности при работе в химической лаборатории.

**ДРОЖЖИ SACCHAROMYCES CEREVISIAE
КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ОБЪЕКТ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ
КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ СЧЕТНОЙ КАМЕРЫ (6 Ч)**

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по работе с биотехнологическими объектами, их количественному учету и оценке физиологического состояния.

Задания:

- 1) изучить теоретический материал, представленный в разд. 1.2;
- 2) рассмотреть дрожжевые клетки под микроскопом;
- 3) произвести подсчет количества дрожжевых клеток в суспензиях с помощью счетной камеры Горяева.

**1.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Приборы и оборудование: микроскоп; счетная камера Горяева; предметные и покровные стекла; пипетки Пастера.

Материалы и реактивы: суспензии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; этиловый спирт; дистиллированная вода; раствор метиленового синего (1:10000); этиловый спирт; фильтровальная бумага; вата.

1.1.1 Микроскопирование дрожжей. Одну каплю дрожжевой суспензии с помощью пипетки Пастера помещают на предметное стекло и рассматривают под микроскопом при увеличении 100–400х. Зарисовывают дрожжевые клетки.

1.1.2 Подсчет дрожжевых клеток с помощью камеры Горяева. Метод прямого подсчета клеток микроорганизмов в счетных камерах успешно приме-

няют для определения общего количества микроорганизмов, содержащихся во взвесах (суспензиях). Метод количественного учета микроорганизмов с помощью счетных камер имеет ограниченное применение, связанное с тем, что счетные камеры могут быть использованы лишь для подсчета относительно крупных объектов – клеток водорослей, дрожжей, спор грибов, микроскопируемых при увеличении 100–400х.

Счетная камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло с нанесенными на него поперечными прорезами, которые образуют три поперечно расположенные плоские площадки (рис. 1.1). Средняя площадка продольным прорезом разделена пополам, причем на каждой половине нанесена квадратная сетка. Две боковые площадки расположены на 0,1 мм выше средней. Эти площадки служат для притирания покровного стекла. Сетка разделена на определенное число больших и маленьких квадратов, по-разному сгруппированных. Постоянной величиной во всех сетках является маленький квадрат, сторона которого равна $1/20$ мм, площадь – $1/400$ мм², а объем при высоте камеры $1/10$ мм – $1/4000$ мм³, или $1/4000000$ см³. Так называемый большой квадрат ABCD состоит из 16 малых квадратов.

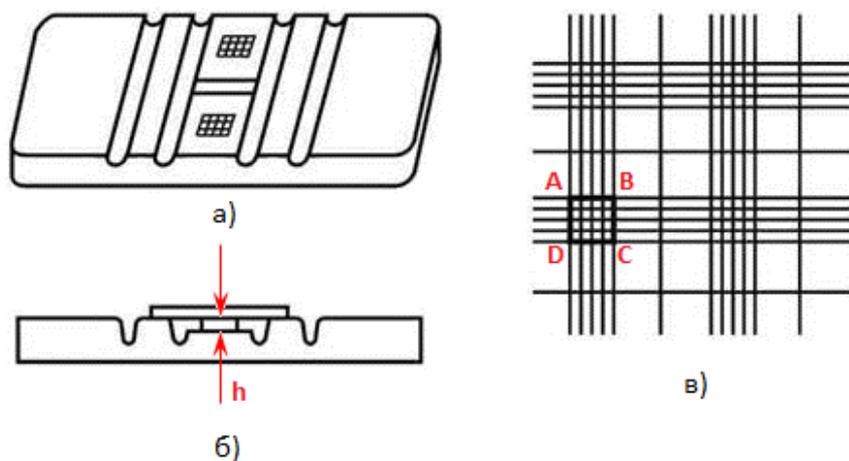


Рисунок 1.1 – Счетная камера Горяева: а) вид сверху; б) вид сбоку; h – глубина камеры; в) увеличенный фрагмент сетки, выделен большой квадрат ABCD, состоящий из 16 малых квадратов

Камера Горяева имеет площадь 9 мм^2 и разбита на 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов в каждом ряду).

Перед началом работы камеру и покровное стекло обрабатывают этиловым спиртом и протирают фильтровальной бумагой.

Суспензию клеток хорошо взбалтывают и отбирают небольшое количество пипеткой Пастера. Каплю взвеси наносят на сетку камеры и сверху накрывают чистым покровным стеклом (рис. 1.2).

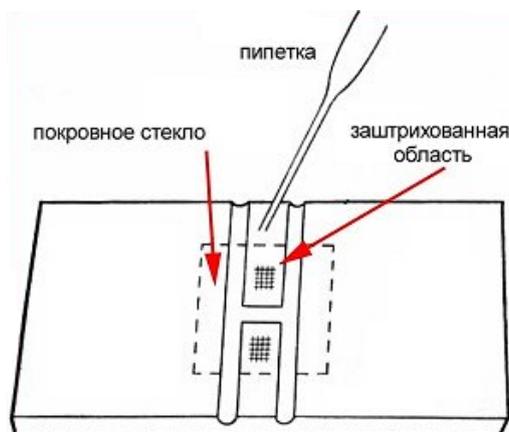


Рисунок 1.2 – Нанесение суспензии микроорганизмов на сетку камеры Горяева

Жидкость под покровным стеклом должна равномерно без пузырьков распределиться по всей сетке, не выступая в желобок между стенками. Большими пальцами покровное стекло плотно притирают к боковым площадкам камеры до появления ньютоновских колец. Камеру с исследуемым материалом помещают на предметный столик микроскопа и микроскопируют при увеличении $100\text{--}400\times$ (в поле зрения должны быть отчетливо видны как квадратики, так и клетки микроорганизмов). Просчитывают количество клеток в пяти больших квадратах (т. е. в 80 малых), расположенных по диагонали. Учитывают все клетки, размещенные внутри квадрата и на пограничных линиях, если они большей частью лежат внутри квадрата. Клетки, разделенные пограничной линией пополам, считают только на двух из четырех границ квадрата, а клетки, лежащие большей своей половиной вне данного квадрата, совсем не учитывают.

Находят среднее количество клеток в одном квадрате. Допустим, в пяти больших квадратах (80 малых) – 240 клеток, тогда в одном малом квадратике среднее количество клеток $240 : 80 = 3$. Пересчет на 1 мл суспензии с учетом разведения производят по формуле:

$$N = \frac{a \cdot 1000 \cdot K}{h \cdot S}, \quad (1.1)$$

где N – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее число клеток в малом квадрате; h – глубина камеры (0,1 мм); S – площадь малого квадрата, мм; K – разведение исходной суспензии; 1000 – коэффициент пересчета см³ в мл (1 мл = 1000 мм³).

Подсчет клеток в одной суспензии проводят в трех повторностях и находят среднее значение. После каждого измерения камеру и покровное стекло тщательно промывают дистиллированной водой и высушивают фильтровальной бумагой. В завершении работы камеру обрабатывают этиловым спиртом.

Результаты подсчета клеток вносят в таблицу вида:

Коэффициент разведения K	Повторность	Число клеток микроорганизмов в большом квадрате счетной камеры					Общее число клеток в малых квадратах	Среднее число клеток a	Количество клеток в исходном образце N
		1	2	3	4	5			
1	1								
	2								
	3								
	Среднее значение								
2									
4									

1.1.3 Подсчет количества живых, мертвых и почкующихся дрожжевых клеток в суспензии. Метод подсчета мертвых дрожжевых клеток основан на окрашивании клеток метиленовым синим. После попадания в цитоплазму

под действием ферментов оксидоредуктаз в живых клетках происходит восстановление красителя до бесцветных соединений. Поэтому в синий цвет окрашиваются только мертвые клетки.

На сетку камеры Горяева наносят каплю дрожжевой суспензии, добавляют каплю раствора метиленового синего, перемешивают, накрывают покровным стеклом, притирают его и выжидают 5 мин. Затем подсчитывают количество живых, мертвых и почкующихся клеток в суспензии.

Результаты подсчета клеток вносят в таблицу вида:

Номер суспензии	Дрожжевые клетки	Число клеток Микроорганизмов в большом квадрате счетной камеры					Общее число клеток в малых квадратах	Среднее число клеток a	Количество клеток в образце N
		1	2	3	4	5			
1	Живые								
	Почкующиеся								
	Мертвые								
...									

1.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Дрожжи представляют собой одноклеточные организмы, относящиеся к царству *Mycota*. В пищевой промышленности широко используются дрожжи из класса сахаромицетов *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи).

Диаметр клеток *S. cerevisiae* составляет 2,5–10 мкм, они имеют округлую, яйцевидную или эллипсоидную форму. Размер и форма клеток одного штамма могут изменяться в зависимости от различных условий культивирования. Схема поперечного разреза дрожжевой клетки представлена на рис. 1.3.

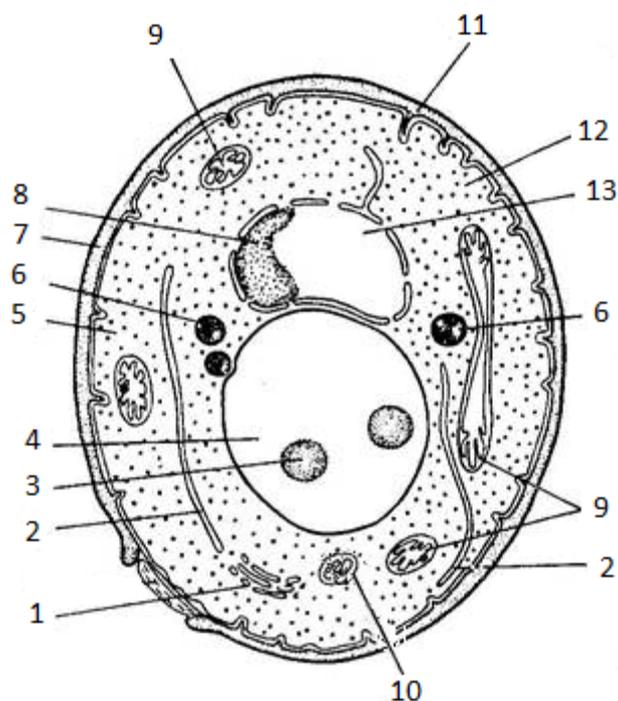


Рисунок 1.3 – Строение дрожжевой клетки: 1 – комплекс Гольджи; 2 – эндоплазматическая сеть; 3 – гранулы волютина; 4 – вакуоль; 5 – рибосомы; 6 – жировые капли; 7 – цитоплазматическая мембрана; 8 – ядрышко; 9 – митохондрии; 10 – лизосома; 11 – клеточная стенка; 12 – цитоплазма; 13 – ядро

Среди структур дрожжевой клетки можно выделить постоянно присутствующие и периодически обнаруживаемые в ней. Постоянно присутствуют в клетках органеллы – структуры, выполняющие определённые функции. К ним относятся ядро с ядрышком, митохондрии, рибосомы, клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, хитосомы, гликосомы.

Клеточная стенка защищает содержимое клетки от воздействия окружающей среды, участвует в регуляции поступления питательных веществ и выведения метаболитов, в размножении клеток. Толщина клеточной стенки составляет около 25 нм, структура включает несколько слоев – липопротеиновая мембрана, маннано-протеиновый комплекс и глюкановый слой.

Глюкан является основным структурным компонентом клеточной клетки дрожжей и представляет собой полимер глюкозы. Маннан является разветвленным полимером маннозы и находится преимущественно во внешних слоях клеточной стенки. Соотношение между количеством глюкана и маннана определяет форму клеточной стенки, ее свойства. При увеличении содержания глюкана клеточная стенка становится менее эластичной, а сама клетка удлиняется. Между глюканом и маннаном находятся структурные белки, которые связаны с полисахаридами дисульфидными мостиками. Третьим полисахаридом в составе клеточной стенки дрожжей является хитин – полимер N-ацетилглюкозамина.

В клеточной стенке сосредоточено некоторое количество запасных веществ – свободных аминокислот, гликогена, полифосфатов.

Между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной находится *периплазматическое пространство*. Периплазма выполняет роль барьера проницаемости, отвечает за контроль транспорта растворенных веществ в клетку, гидролиза некоторых компонентов среды для дальнейшего их транспорта через цитоплазматическую мембрану. В периплазматическом пространстве происходит регуляция биосинтеза клеточной стенки дрожжей.

За периплазматическим пространством располагается *цитоплазматическая мембрана* дрожжевой клетки. Цитоплазматическая мембрана выполняет следующие функции:

- отделяет клеточную стенку и периплазматическое пространство от содержимого клетки;
- выполняет роль осмотического барьера для поступления веществ в клетку и выхода из нее;
- участвует в транспорте веществ, энергии и информации внутрь клетки и из нее;
- участвует в регуляции биосинтеза клеточной стенки;
- содержит ферменты, необходимые для усвоения сахаров, аминокислот.

Цитоплазматическая мембрана дрожжевой клетки состоит из липопротеидов и имеет трехслойную структуру. Внутренние слои состоят из липидов:

моно-, ди- и триацилглицеридов. На поверхности мембраны расположены гидрофильные полярные части фосфолипидов. Цитоплазматическая мембрана дрожжей может осуществлять пино-, фаго- и экзоцитоз. Пиноцитоз заключается в способности захватывать из среды капли белковых растворов, растворов липидов и углеводов. Фагоцитоз – захват твердых частиц, экзоцитоз – удаление продуктов обмена из клетки в периплазматическое пространство.

Содержимое клетки включает ядро и цитоплазму. *Ядро* является основным, но не единственным носителем наследственной информации, и контролирует все обменные реакции организма. Ядро округлой формы, покрыто двойной мембраной с множеством пор. Генетическая информация в ядре распределена между хромосомами – нитевидными структурами, состоящими из ДНК, основными белками – гистонами и некоторым количеством негистоновых белков. У *S. cerevisiae* 17 хромосом. Размер каждой хромосомы у дрожжей приблизительно в два раза меньше бактериальной и в 100 раз меньше, чем у человека. В ядре содержится *ядрышко* – органелла, богатая РНК. В нем синтезируется высокомолекулярная РНК, из которой затем образуются рибосомальные РНК. Эти РНК и синтезируемые в других участках хромосом матричные РНК (м-РНК) выходят через ядерные поры в цитоплазму, где происходит сборка рибосом и синтезируется основная масса клеточных белков. Поэтому у активно размножающихся клеток поры широко открыты.

Цитоплазма – это содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной. Цитоплазма представляет собой сложную коллоидную систему: матрикс (цитозоль) цитоплазмы состоит из белков и РНК (коллоидная часть), а также аминокислот, жирных кислот, сахаров, органических и неорганических веществ, нуклеотидов, которые образуют истинные растворы. В матриксе располагаются все органоиды клетки, которые связаны в единую систему.

Рибосомы – самые маленькие по размеру структуры (диаметр до 20 нм), функция которых состоит в биосинтезе белка. Рибосомы состоят из белка (50 %) и РНК (42–50 %). На их долю приходится около 15 % сухой массы цитоплазмы.

Митохондрия – полуавтономная клеточная структура, окруженная двойной трехслойной липопротеидной мембраной. Митохондрии являются своего рода энергетическими депо клетки, в которых синтезируются АТФ. Митохондрия окружена двойной трехслойной липопротеидной мембраной толщиной 6–10 нм каждая. Между мембранами располагается перимитохондриальное пространство, приближающееся к 10 нм. Внутренняя мембрана митохондрии образует складки – кристы. Внутри митохондрии находится матрикс, в котором сосредоточены ферменты цикла трикарбоновых кислот. Чем более интенсивно протекают биосинтетические процессы в митохондрии, тем больше крист в митохондрии. В анаэробных условиях количество крист в митохондриях уменьшается, а сами митохондрии деградируют.

Эндоплазматическая сеть, или эндоплазматический ретикулум, представляет собой систему канальцев, цистерн и пузырьков, которые пронизывают всю протоплазму клетки и соединяются друг с другом и другими органеллами, в частности, с ядром и рибосомами. Эндоплазматическая сеть развита больше в аэробных дрожжах, чем в анаэробных, а в молодых клетках больше, чем в старых. На поверхности эндоплазматической сети находятся многочисленные ферменты. Эндоплазматическая сеть обеспечивает синтез и передвижение различных метаболитов в клетке, а также является временным хранилищем выработанных продуктов.

Эндоплазматический ретикулум делится на шероховатый и гладкий. В первом случае на поверхности мембраны, обращенной к цитоплазме, находятся рибосомы, на которых идет синтез белка. Гладкий ретикулум является производным от шероховатого и участвует в синтезе липидов и углеводов. Морфология эндоплазматического ретикулума зависит от условий культивирования, фазы роста дрожжей и физиологического состояния клеток.

Канальцы и микроцистерны эндоплазматического ретикулума способны утолщаться, соединяться друг с другом, при этом образуются крупные полости – *вакуоли*. Функция вакуоли заключается в поддержании внутриклеточного дав-

ления. Также в вакуоли скапливаются низкомолекулярные продукты гидролиза, например, свободные аминокислоты, липиды.

Значительная часть гладких мембран отделена от эндоплазматического ретикулума и организована в самостоятельные структурные образования, которые называются *комплексом Гольджи*. Аппарат Гольджи принимает участие в построении клеточной мембраны, в формировании лизосом, вакуолей, имеет непосредственное отношение к секреции белков и полисахаридов, а также выполняет функции транспорта секретируемых веществ в другие участки клетки и к ее поверхности.

Лизосомы – органеллы, окруженные однослойной мембраной, осуществляют «пищеварительные» функции. Они являются производными эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Лизосомы заполнены гидролитическими ферментами и осуществляют разложение и переваривание полимеров.

Хитосомы грибов содержат фермент хитинсинтазу, которая катализирует синтез микрофибрилл хитина.

Пероксисомы – органеллы, в которых аккумулированы окислительно-восстановительные ферменты, например, каталаза, которая восстанавливает пероксид водорода до воды.

Дрожжи размножаются почкованием. При этом дочерняя клетка возникает в виде маленькой почки, которая растет в течение большей части клеточного цикла (рис. 1.4).

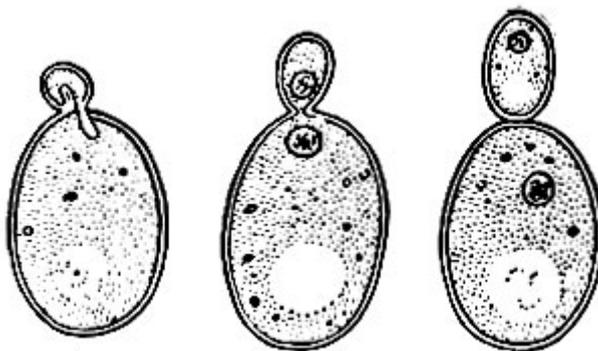


Рисунок 1.4 – Почкующиеся дрожжевые клетки

По достижении почкой размера материнской клетки между ними появляется перегородка сложного состава. После отделения почки на материнской клетке образуется рубец – дочерний шрам, а на дочерней клетке – родовой шрам. На одном и том же месте клеточной стенки никогда не появляются две почки. Следовательно, каждый раз почка оставляет новый дочерний шрам на стенке материнской клетки. Подсчитав число таких шрамов, можно определить, сколько почек образовала данная клетка и таким образом оценить ее возраст.

Контрольные вопросы

- 1) Назовите основные органеллы дрожжевой клетки.
- 2) Какова функция клеточной стенки? Из каких полимеров она состоит?
- 3) Какова функция лизосом в дрожжевой клетке?
- 4) Каким образом в дрожжевой клетке осуществляет хранение наследственной информации?
- 5) Что представляет собой камера для подсчета клеток микроорганизмов? Опишите порядок работы с ней.
- 6) Для подсчета каких микроорганизмов используется камера Горяева?
- 7) На чем основан метод подсчета живых и мертвых дрожжевых клеток в суспензии?

**ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE В ЛАБОРАТОРНОМ ФЕРМЕНТЕРЕ
(6 Ч)**

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по биотехнологии периодического культивирования микроорганизмов в ферментере и оценке эффективности процесса.

Задания:

- 1) изучить теоретический материал, представленный в разд. 2.2;
- 2) изучить устройство и принцип работы лабораторного ферментера;
- 3) произвести расчет количества питательной среды и инокулята;
- 4) осуществить культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в лабораторном ферментере периодического действия;
- 5) установить зависимость концентрации дрожжевых клеток, биомассы, углеводов в среде от времени культивирования;
- 6) рассчитать экономический коэффициент по потреблению основного субстрата.

**2.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Приборы и оборудование: лабораторный ферментер; микроскоп; термовивиметрический анализатор влажности; сушильный шкаф; электрическая плитка; рН-метр; весы технические; весы аналитические; счетная камера Горяева; колба Бунзена с воронкой Бюхнера; вакуумный насос; стерильная колба с пробкой объемом 3 дм³; коническая колба объемом 100 см³; мерные цилиндры объемом 10 и 25 см³; мерная пипетка объемом 1 см³; стаканчики объемом 30 см³; бюксы алюминиевые с бумажными фильтрами; стеклянные палочки.

Материалы и реактивы: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*; соевая или свекловичная меласса; диаммоний фосфат; сульфат аммония; сульфат магния; карбамид (мочевина); калий хлористый; дрожжевой автолизат; дистиллированная вода; этиловый спирт; покровное стекло; пипетки Пастера; фильтровальная бумага; вата.

2.1.1 Расчет и приготовление питательной среды. Состав питательной среды для культивирования хлебопекарных дрожжей представлен в табл. 2.1. Для размножения и поддержания жизнедеятельности дрожжей питательная среда должна содержать порядка 10 % сухих веществ. Вначале устанавливают содержание сухих веществ в мелассе, поскольку оно существенно зависит от ее вида и способа получения, и затем производят расчет добавленной мелассы и дистиллированной воды.

Таблица 2.1 – Состав питательной среды для культивирования дрожжей

Компонент среды	Количество, г/дм ³
Меласса	*
Дистиллированная вода	*
Диаммоний фосфат	1,5
Сульфат аммония	1,5
Сульфат магния	0,5
Карбамид (мочевина)	0,7
Калий хлористый	2,0
Дрожжевой автолизат	7,0

**Устанавливают расчетным путем*

Исследование содержания сухих веществ проводят экспресс-методом с помощью термогравиметрического анализатора влажности (рис. 2.1). Принцип заключается в высушивании навески исследуемого продукта до постоянной массы.

Прибор включают. Специальную чашку помещают в держатель для чашки и устанавливают на платформу для взвешивания, осуществляют тарирование. В чашку помещают 3–3,5 г исследуемого материала, равномерно распределяют по поверхности и закрывают крышку прибора. Нажимают кнопку «пуск». Показания прибора (содержание воды) снимают после характерного звукового сигнала.

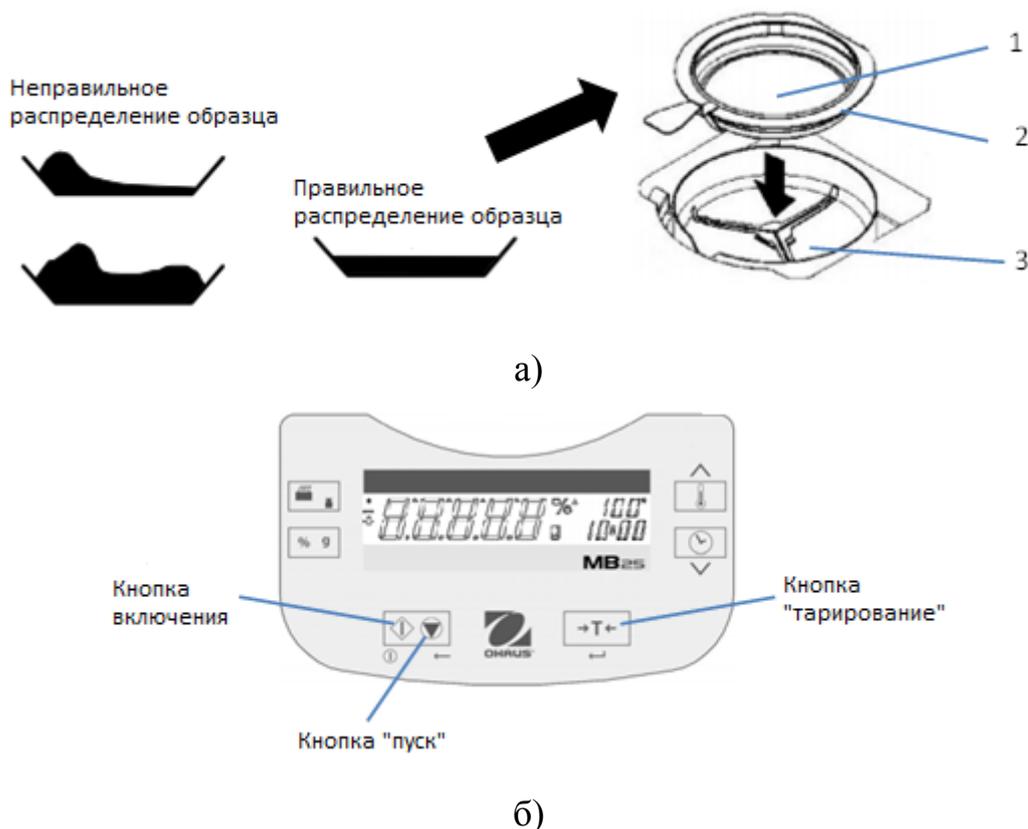


Рисунок 2.1 – Исследование содержания воды и сухих веществ с помощью термogrавиметрического анализатора влажности: а) распределение образца в чашке (1) и установка чашки в держателе (2) на платформу для взвешивания (3); б) органы управления и дисплей прибора

Для приготовления питательной среды с содержанием сухих веществ 10 % вначале рассчитывают необходимое количество мелассы в пересчете на сухое вещество ($M_{св}$):

$$M_{св} = 100 - C, \quad (2.1)$$

где C – количество других сухих компонентов питательной среды, г.

Общее количество добавленной мелассы (M) рассчитывают по формуле:

$$M = \frac{M_{CB} \times 100}{CB_M}, \quad (2.2)$$

где CB_M – содержание сухих веществ в мелассе, %.

Готовят 2,5 л питательной среды. Сухие компоненты и мелассу дозируют в кастрюлю, после чего добавляют дистиллированную воду, тщательно перемешивают и кипятят в течение 15 мин. Параллельно определяют рН питательной среды с помощью рН-метра. рН питательной среды должен находиться в интервале 4,2–5,5. Для регулирования рН используют раствор уксусной кислоты или аммиачную воду. Питательную среду переливают в стерильную колбу, закрывают крышкой и хранят в холодильнике.

2.1.2 Расчет количества посевного материала. Количество дрожжей для ввода в ферментер составляет 0,5 г на 100 см³ питательной среды в расчете на абсолютно сухие дрожжи. Для расчета количества посевного материала определяют содержание сухих веществ в дрожжах (CB_D) с помощью термогравиметрического анализатора влажности (п. 2.1.1). Количество посевного материала (X) на 100 см³ питательной среды рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,5 * 100}{CB_D}. \quad (2.3)$$

После этого рассчитывают общее количество дрожжей, необходимое для засева 2,5 л питательной среды.

2.1.3 Культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в лабораторном ферментере. Схема лабораторного ферментера периодического действия представлена на рис. 2.2.

Работа с ферментером осуществляется следующим образом:

1. Для работы ферментера необходимо подключить его к сети электропитания.

2. Для запуска теплообменника (15) необходимо открыть клапан подачи воды (16), отрегулировать давление воды. Теплообменник включается с помощью тумблера «Сеть» (25). При начале процесса стерилизации и ферментации вода перекрывается сначала в теплообменнике для создания закрытой системы, а затем и сам водопроводный кран. Проведение стерилизации ферментера со средой при температуре 121 °С в течение 20 мин. Установка температуры и времени стерилизации проводится в Settings→Set points→Sterilization, запуск процесса – в Run-stop process.

3. Для внесения питательной среды и посевного материала в крышке ферментера (1) имеется специальное отверстие (6).

4. Настройка параметров ферментации: Settings→Set points→Fermentation.

5. Включение и регуляция скорости мешалки производится вручную на самой мешалке (12).

6. Запуск ферментации: Run-stop process.

7. При окончании процесса необходимо нажать на stop process. Охладить систему посредством открытия зажима (16) и подачи воды для циркулирования. Выключить прибор из сети электропитания. Затем через пробоотборник (10) извлечь продукты ферментации, очистить реактор.

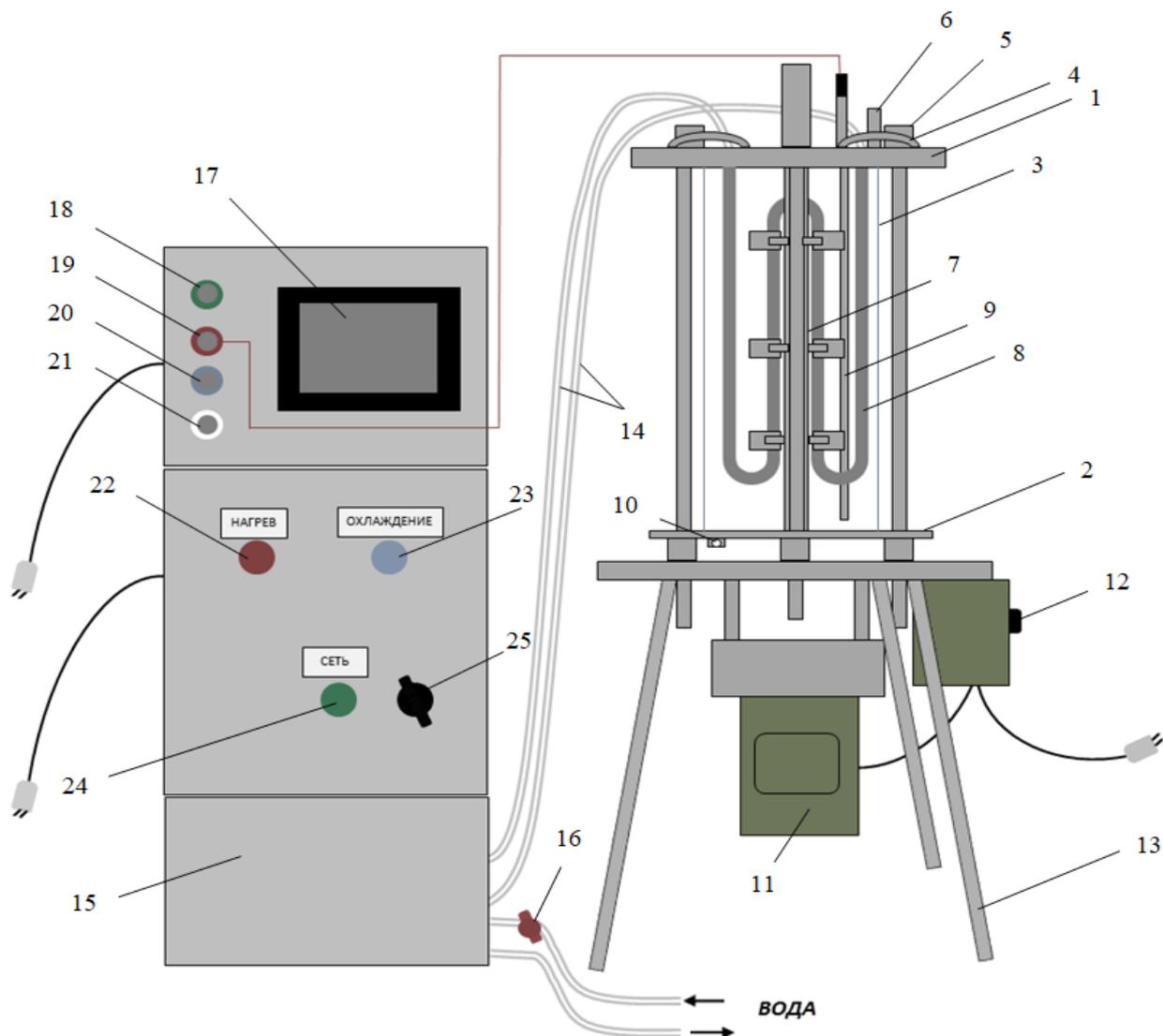


Рисунок 2.2 – Лабораторный ферментер периодического действия:

1 – крышка; 2 – дно; 3 – стеклянный сосуд; 4 – ручка крышки; 5 – крепление крышки; 6 – отверстие для подачи питательной среды и инокулята; 7 – мешалка; 8 – змеевик теплообменника; 9 – термодатчик; 10 – пробоотборник; 11 – мотор; 12 – тумблер включения и регуляции скорости вращения мешалки; 13 – опора; 14 – шланги циркулирующей воды; 15 – теплообменник; 16 – клапан подачи воды; 17 – сенсорная панель управления; 18 – разъем для подключения индикатора давления; 19 – разъем для подключения термодатчика; 20 – разъем для подключения кислородного электрода; 21 – разъем для подключения рН-электрода; 22, 23 – индикаторы нагрева и охлаждения; 24 – индикатор включения теплообменника; 25 – тумблер включения теплообменника

Важно!

1. *Электрические провода не должны пересекаться со шлангами циркулирующей воды!*

2. *При разборке реактора требуется помнить, что конструкция представляет собой стеклянный цилиндр, герметичность которого обеспечивается за счет плотного прикручивания с помощью зажимов верхней крышки ферментера. Поэтому если не извлечь продукты синтеза перед разборкой реактора, все его содержимое выльется.*

1) Предварительно в питательной среде определяют содержание сахаров с помощью портативного рефрактометра (п. 2.1.6).

2) Убеждаются в герметичном соединении сосуда ферментера и его дна.

3) Отмеренное количество дрожжей для засева задают в ферментер через отверстие в крышке, после чего подают питательную среду.

4) Включают мешалку. Скорость перемешивания не должна быть слишком большой.

5) С помощью панели управления задают требуемую температуру. Для роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* оптимальной является температура 30–32 °С. Необходим постоянный контроль температуры в ферментере. Регулирование температуры при необходимости осуществляют включением/выключением теплообменника, подачей холодной воды.

6) Через 5 мин отбирают первую пробу объемом 10 см³ (нулевая точка) и определяют концентрацию дрожжевых клеток с помощью счетной камеры Горяева.

7) Культивирование ведут в течение 4 ч, отбирают пробы объемом 30 см³ через 15 мин, 1, 2, 3, 4 ч с момента отбора нулевой пробы. В пробе определяют: концентрацию дрожжевых клеток, их биомассу, содержание сахаров в культуральной жидкости, рН. При значительном сдвиге рН в кислую сторону среду подтитровывают аммиачной водой до оптимальных уровней 4,2–5,5.

8) По завершении культивирования ферментер отключают от электропитания, через пробкоотборник сливают культуральную жидкость, несколько раз

промывают ферментер водой, после чего снимают крышку, тщательно моют и протирают сосуд для культивирования.

2.1.4 Определение числа дрожжевых клеток. Концентрацию дрожжевых клеток определяют методом подсчета в камере Горяева (см. лабораторную работу № 1). Суспензию дрожжей готовят из расчета содержания количества клеток в одном большом квадрате не более 30. Разведение популяции учитывают при расчете концентрации дрожжей в культуральной жидкости, поэтому этот показатель должен быть зафиксирован. Например, если плотность популяции в ферментёре достаточно велика, готовят разведение в 10 раз (1 см³ культуральной жидкости + 9 см³ водопроводной воды). Количество дрожжевых клеток в 1 см³ суспензии рассчитывают по формуле (1.1). Каждый раз готовят три параллельные суспензии. Результаты подсчета клеток оформляют в виде таблицы:

Время нахождения культуры в ферментере, ч	Номер суспензии	Коэффициент разбавления	Количество клеток микроорганизмов в большом квадрате счетной камеры					Общее число клеток в малых квадратах	Среднее число клеток <i>a</i>	Количество клеток в исходном образце <i>N</i>
			1	2	3	4	5			
0	1									
	2									
	3									
	Среднее значение									
0,4										
1										
2										
3										
4										

2.1.5 Определение биомассы весовым методом. Высушенные до постоянной массы бюксы с бумажными фильтрами извлекают из сушильного шкафа, закрывают крышками, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Фильтр извлекают из бюкса и помещают на воронку Бюхнера таким образом, чтобы он плотно прилегал к ее поверхности и закрывал все отверстия. Включают вакуумный насос, присоединенный к колбе Бунзена и фильтруют 25 см³ отобранной культуральной жидкости. Отделившуюся жидкость используют для определения общего содержания сахаров (п. 2.1.6). Осадок на фильтре промывают небольшим количеством дистиллированной воды для освобождения от компонентов питательной среды, после чего фильтр с осадком переносят в бюкс и помещают в сушильный шкаф при температуре 100–103 °С не менее чем на 10 ч.

Для удобства результаты взвешивания оформляют в виде таблицы:

Номер бюкса	Время нахождения культуры в ферментере, ч	Масса пустого бюкса с фильтром, г	Масса бюкса с дрожжевым осадком на фильтре после высушивания, г
	0,4		
	1		
	...		

Биомассу (по сухому веществу дрожжей) в заданном объеме культуральной жидкости находят по формуле:

$$X = \frac{V \cdot (M_{62} - M_{61})}{25}, \quad (2.4)$$

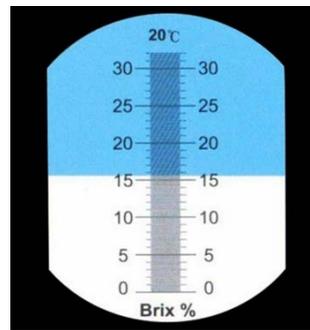
где X – биомасса дрожжей; M_{61} – масса бюкса с фильтром, г; M_{62} – масса бюкса с дрожжевым осадком на фильтре после высушивания г; $V = 1000$ – объем культуральной жидкости, см³; 25 см³ – объем пробы.

Биомассу в нулевой точке рассчитывают, исходя из количества внесенного посевного материала.

2.1.6 Определение общего содержания сахаров в культуральной жидкости. Для определения общего содержания сахаров используют культуральную жидкость, от которой были отделены дрожжевые клетки фильтрованием (п. 2.1.5). 1–2 капли жидкости помещают на призму портативного рефрактометра (рис. 2.3, а), закрывают прозрачную пластину, направляют переднюю часть рефрактометра к источнику света. Показания считывают по границе между светлой и темной областями (рис. 2.3, б). После каждого измерения на призму наносят несколько капель дистиллированной воды и протирают мягкой хлопчатобумажной тканью.



а)



б)

Рисунок 2.3 – Портативный рефрактометр: а) нанесение пробы; б) снятие показаний

Результаты оформляют в виде таблицы:

Время, чч:мм	Время нахождения культуры в ферментере, ч	Число дрожжевых клеток в 1 мл культуральной жидкости N	Биомасса дрожжей в 1 л культуральной жидкости X	Общее содержание сахаров в культуральной жидкости, %	pH
	0				
	0,4				
	1				
	2				
	3				
	4				

По данным таблицы строят зависимости:

- числа клеток от времени культивирования в полулогарифмических координатах;

- биомассы дрожжей и содержания сахаров в культуральной жидкости от времени культивирования.

2.1.7 Расчет экономического коэффициента. Глубину исчерпания субстрата оценивают по количеству потребленных углеводов. Для этого рассчитывают общую биомассу в нулевой точке (X_0) и в конце культивирования (X_k) по формуле (2.4) с той разницей, что вместо V подставляют общий объем культуральной жидкости в начале и в конце культивирования (замеряют мерным цилиндром).

Экономический коэффициент (Y) рассчитывают путем деления урожая биомассы ($X_k - X_0$), г, на количество потребленного субстрата (сахаров, ΔS) и выражают в %:

$$Y = \frac{(X_k - X_0)}{\Delta S} \cdot 100. \quad (2.5)$$

2.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды является вода. Питательные вещества образуют истинные растворы (минеральные соли, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т. д.) и коллоидные растворы (белки, липиды, неорганические соединения – гидроксид железа). Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии, всплывать, равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный слой.

При промышленном получении дрожжей используемое сырье должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легкодоступным: свекловичная меласса, меласная барда, зерно-картофельная барда, отходы пивоварения, пшеничные отруби. Питательная среда должна содержать источники углерода, азота, фосфора, минеральных веществ, витаминов, ростовые факторы.

В качестве основного компонента питательной среды и *источника углерода* для культивирования дрожжей и пользуют *мелассу*. Меласса содержит большое количество углеводов, а также многие необходимые для роста и размножения дрожжей вещества.

Свекловичная меласса является побочным продуктом сахарного производства и получается при отделении кристаллов сахарозы на центрифугах. Свекловичная меласса представляет собой густую вязкую непрозрачную темно-коричневую жидкость со специфическим запахом карамели, меланоидинов и триметиламина. Массовая доля сухих веществ составляет 70–83 %. Химический состав свекловичной мелассы зависит от многих факторов выращивания и переработки свеклы. В составе мелассы моно- и олигосахарды (около 30 %), органические кислоты, азотсодержащие вещества (14,8 %), существенную часть составляет бетаин. В свекловичной мелассе содержатся витамины: биотин (0,01 мг%), тиамин (0,3 мг%), рибофлавин (0,04 мг%), пиридоксин (0,54 мг%), никотиновая кислота (5,1 мг%), пантотеновая кислота (8,0 мг%), фолиевая кислота (0,02 мг%), инозит (700 мг%). Меласса полностью растворима в воде.

При получении высокобелковых продуктов из сои накапливается фракция, обогащенная растворимыми углеводами сои, после удаления воды из которой образуется соевая меласса. Она представляет собой вязкий коричневый сироп с горьковато-сладким запахом. Массовая доля сухих веществ составляет около 50 %. В состав соевой мелассы входят моносахариды (в небольшом количестве), ди- и олигосахариды, полифенольные соединения (изофлавоны), фосфолипиды и фенольные кислоты, витамины. Химический состав соевой мелассы зависит от типа экстракции. В зависимости от этого в соевой мелассе может варьироваться содержание некрахмалистых полисахаридов, белка.

Источники азота. Клетки дрожжей в большом количестве содержат азотистые вещества, поэтому питательная среда должна содержать необходимые для их синтеза компоненты. Дрожжи не могут усваивать нитраты, нитриты, а также аминокислоты в составе белков. В качестве источников азота дрожжи используют свободные аминокислоты и ионы аммония (NH_4^+). Наиболее подходящим азотистым питанием для дрожжей являются свободные аминокислоты (хуже усваиваются пептоны), водный раствор аммиака и аммиачные соли, карбамид (мочевина). Для нормального питания дрожжей питательная среда должна содержать не менее 140 мг аминного азота на 1 л. Богатым источником свободных аминокислот являются дрожжевые автолизаты и экстракты, которые представляют собой разрушенную под действием ферментов дрожжевую массу и содержат до 6 % аминного азота.

Источники макроэлементов. Фосфор в дрожжевой клетке входит в состав нуклеиновых кислот, АТФ, фосфолипидов, полимеров клеточной стенки. При недостатке фосфора в сусле, особенно на начальной стадии брожения, наблюдается пониженный прирост биомассы дрожжей, клетки обедняются белком и витамином В₂. Дрожжи расходуют от 10 до 13 мг фосфора на прирост 10 млрд. клеток. Источниками фосфора в питательных средах являются ортофосфорная кислота и диаммонийфосфат.

Калий содержится в дрожжах в значительных количествах и играет важную роль в обмене веществ. Он выполняет роль кофермента, участвует в регуляции транспорта ионов через клеточную стенку и митохондриальную мембрану. Калий тесно связан с размножением дрожжей и скоростью брожения.

Магний имеет большое значение в энергетическом обмене дрожжей, связанном с ростом и размножением клеток. Экономический коэффициент потребленного магния в расчете на ионы варьирует в пределах от 300 до 900 г сухой биомассы на 1 г магния, для дрожжей эта величина обычно составляет 540 г/г магния.

Для нормального размножения дрожжей необходима сера, которая участвует в синтезе таких аминокислот, как цистеин и метионин. Небольшое количе-

ство серы требуется для образования сульфогрупп в некоторых коферментах. Было установлено, что в дрожжах при дефиците серы в среде наблюдается снижение дыхательной активности клеток. Экономический коэффициент в расчете на ионы SO_4^{2-} для дрожжей составляет 100 г сухой биомассы на 1 г серы.

Источники микроэлементов. Для роста дрожжей необходимы микроэлементы: марганец, железо, кобальт, медь, цинк. Данные микроэлементы активируют различные ферменты, в том числе дыхательные. Медь и железо стимулируют почкование клеток, марганец и цинк повышают бродильную активность. Экономические коэффициенты выхода биомассы (кг) в расчете на 1 г: железа – 10,8; марганца – 54,0; цинка – 5,4; меди – 135,5; кобальта – 100. Микроэлементы вносятся в питательную среду в составе различных подкормок для дрожжей. При превышении их содержания в среде, может проявляться токсическое действие на дрожжевые клетки, количество микроэлементов в питательной среде составляет десятые доли миллиграммов на 1 л.

Факторы роста. Факторами роста являются вещества, которые содержатся в дрожжевых клетках, но не могут ими синтезироваться. Факторами роста для всех штаммов дрожжей являются биотин (витамин Н), пантотеновая кислота (витамин В₃) и мезоинозит (витамин В₈). Некоторые штаммы дрожжей испытывают потребность также и в пиридоксине (витамина В₆). Кроме этих витаминов следует обратить внимание на тиамин (витамин В₁), который является активатором брожения.

Фаза роста дрожжей определяет химический состав клеток и устойчивость их к стрессовым факторам. Кривая роста и размножения дрожжевых клеток подразделяется на несколько фаз.

Начальная фаза (лаг-фаза, латентная фаза). Видимые признаки размножения дрожжей отсутствуют, однако обменные процессы в клетках протекают активно: в среду выделяются экзо-ферменты для расщепления высокомолекулярных питательных веществ, внутри клетки синтезируются нуклеиновые кислоты и ферменты, необходимые для дальнейшего активного роста. Продолжительность фазы приспособления (адаптации) зависит от внешних условий,

штаммовых особенностей дрожжей, нормы введения и возраста клеток и их состава. «Голодные», или старые, много раз делившиеся дрожжи медленнее адаптируются к новым условиям, поэтому имеет место увеличение длительности этой фазы. Кроме того, может наблюдаться снижение концентрации клеток в этот период за счет автолиза физиологически слабых особей (рис. 2.4 – 1).

Фаза ускорения роста – это фаза постепенного начала размножения, скорость деления клеток возрастает с ускорением. Клетки увеличиваются в объеме из-за большого количества молодых клеток и удлиняются. Количество мертвых клеток невелико, доля почкующихся клеток начинает возрастать. Клетки наиболее чувствительны к неблагоприятным факторам (рис. 2.4 – 2).

Экспоненциальная (логарифмическая, лог-фаза) фаза. Характеризуется максимальной скоростью размножения. Численность клеток и их биомасса возрастает в геометрической прогрессии. Все клетки находятся в диспергированном состоянии и активны. Потребление кислорода быстро достигает максимального. Клетки чувствительны к стрессовым факторам (рис. 2.4 – 3).

Фаза замедления роста – снижающаяся концентрация питательных веществ в среде, когда накапливаются токсичные продукты метаболизма и возрастает плотность биомассы клеток. Это приводит к замедлению роста размножения и даже к частичной гибели клеток. Потребление кислорода постепенно снижается. Понижается активность дыхательных ферментов. Синтезируются запасные углеводы. Клетки более устойчивы к стрессам (рис. 2.4 – 4).

Стационарная фаза – размножение дрожжей практически прекращается. Требуется отделить дрожжи от продуктов метаболизма дрожжей, оказывающих токсическое действие на клетки (рис. 2.4 – 5).

Фаза затухания (отмирания) – период, когда в результате истощения питательной среды и максимального накопления продуктов обмена скорость отмирания и автолиза клеток превышает скорость их размножения (рис. 2.4 – 6).

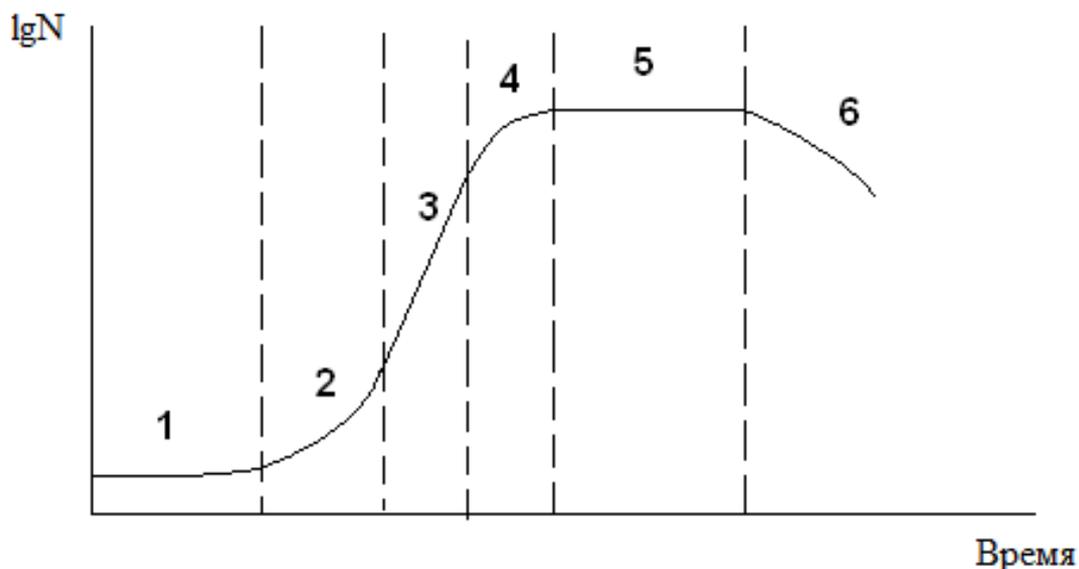


Рисунок 2.4 – Кривая роста микроорганизмов при периодическом культивировании: N – число клеток

При ферментации необходимо создать оптимальные условия для культивирования выбранного штамма. Существенное отклонение от этих условий приводят к снижению интенсивности брожения, замедлению скорости размножения клеток и их гибели.

Выделяющийся в процессе сбраживания углеводов спирт оказывает токсическое воздействие на клетки за счет увеличения проницаемости и пористости клеточной мембраны. В результате нарушается транспорт питательных веществ. Кроме того, возникает дефицит доступной цитоплазме воды. При содержании в культуральной жидкости этанола выше 1,2 % происходит снижение удельной скорости роста дрожжей, концентрация от 2 % приводит к уменьшению выхода биомассы. Содержание этанола 8–9,5 % полностью подавляет рост дрожжей.

Значительное влияние на обмен дрожжевых клеток оказывает температура. Температура влияет на скорость клеточных реакций, природу метаболизма, пищевые потребности и состав биомассы, на уровень РНК, белка, липидный и углеводный состав клеток. Зависимость удельной скорости роста дрожжей и продолжительности генерации представлена на рис. 2.5. Показано, что темпе-

раатурный диапазон роста грибов, к которым относятся и дрожжи, составляет около 30 °С. При температуре выше 45 °С размножение дрожжей полностью прекращается, начинается их гибель.

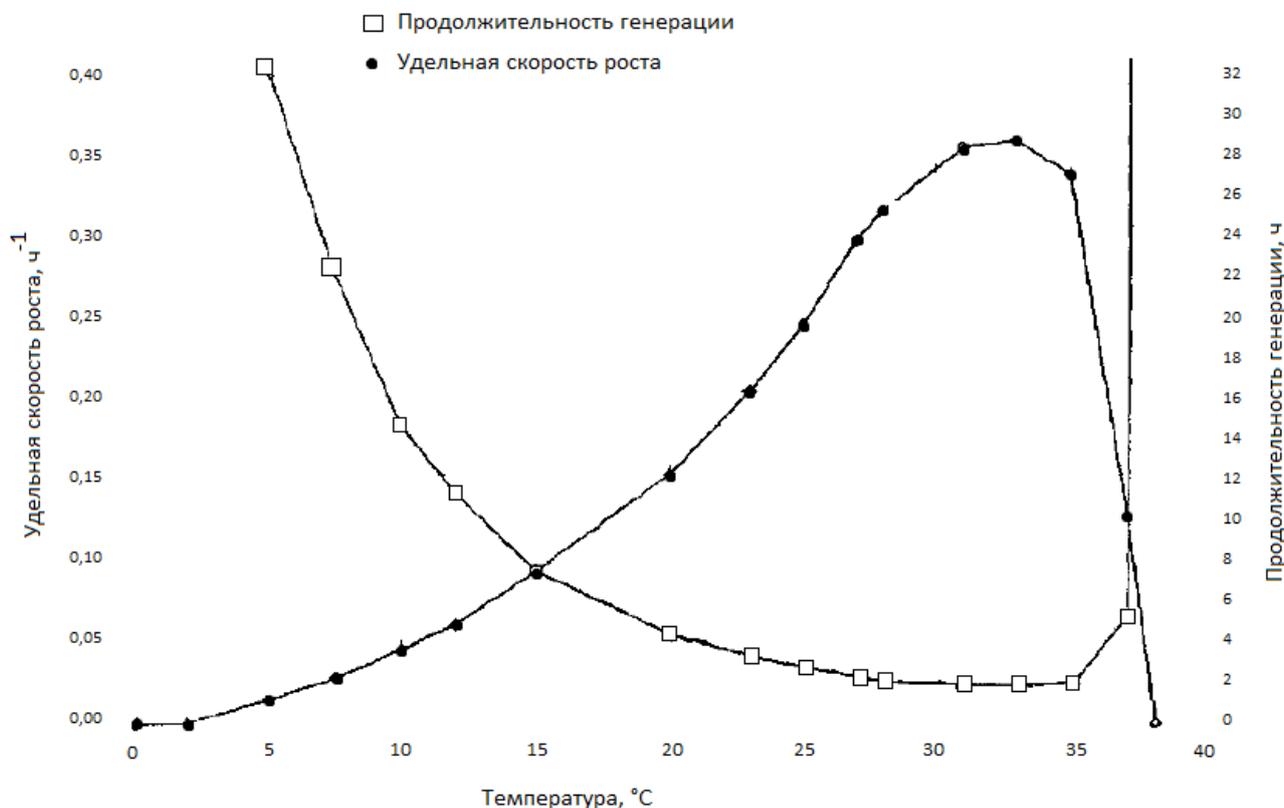


Рисунок 2.5 – Зависимость скорости роста дрожжей от температуры

Величина рН оказывает существенное влияние на метаболизм дрожжей, что отражается на выходе биомассы, скорости роста клеток и синтезе вторичных метаболитов. Значение рН влияет на природу конечного продукта сбраживания сахаров: при кислых значениях рН образуется этиловый спирт, при щелочных – глицерин и уксусная кислота. Величина рН влияет на диссоциацию кислот и оснований, следовательно, оказывает влияние на перенос питательных веществ внутрь клетки, а также на степень токсичности ингибиторов роста. Величина рН также может влиять на метаболизм дрожжей за счет изменения конформации молекул ферментов.

Дрожжи живут в достаточно широком диапазоне рН – от 2 до 6, оптимальным является рН 4,8. При культивировании дрожжей значение рН может изменяться. Существенное снижение показателя отмечается при аэробном культивировании. Для восстановления оптимального рН дрожжей используется аммиачная вода (раствор NH_4^+OH), ортофосфорная кислота, молочная кислота.

Контрольные вопросы

- 1) Из каких компонентов состоит питательная среда для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*? Что является основным источником углерода в ней?
- 2) Что такое меласса? Каков ее химический состав и физические свойства?
- 3) Что такое факторы роста? Какие вещества к ним относятся?
- 4) Как устроен лабораторный ферментер? Назовите правила работы с ним.
- 5) Как определяется количество посевного материала для ввода в ферментер?
- 6) Назовите оптимальные условия для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
- 7) По каким параметрам осуществляется контроль роста культуры *Saccharomyces cerevisiae* в ферментере?
- 8) Назовите фазы роста культуры при периодическом культивировании.
- 9) Какие факторы лимитируют рост культуры *Saccharomyces cerevisiae*?
- 10) Что такое экономический коэффициент? Как он определяется?

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ РАСТЕНИЙ И ЕЕ СУСПЕНЗИОННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ (6 Ч)

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по биотехнологии получения и культивирования растительных тканей.

Задания:

- 1) изучить теоретический материал, представленный в разд. 3.2;
- 2) получить и исследовать каллусную ткань из проростков растительных объектов;
- 3) осуществить процесс суспензионного культивирования каллусной ткани;
- 4) установить зависимость плотности суспензионной культуры от времени культивирования.

3.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: ламинар-бокс; термостат; лабораторный шейкер; весы технические; счетная камера Горяева; стерильные чашки Петри; стерильные колбы объемом 250 см³ с ватно-марлевыми пробками; стерильные пинцеты, скальпели, препарировальные иглы; стерильная кафельная плитка; спиртовка; мерные пипетки объемом 1 и 2 см³; шприц; стаканчики объемом 30 см³.

Материалы и реактивы: семена фасоли; проростки картофеля длиной 10–12 см; питательная среда для индукции каллусогенеза: среда Мурасиге и Скуга + 20 г/л сахара + 100 мг/л мезоинозит + 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота + 0,2 мг/л кинетин (по приложению 1); питательная среда для суспензионной культуры: питательная среда Мурасиге-

Скуга + 20 г/л сахара + 100 мг/л мезоинозит + 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (по приложению 1); 6%-ный раствор хлораминна; 8%-ный раствор оксида хрома; этиловый спирт; дистиллированная вода; фильтровальная бумага; вата; парафильм.

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности. Для обеспечения асептических условий при культивировании растительных клеток необходимо все операции проводить в ламинар-боксе.

Ламинар-бокс представляет собой лабораторный шкаф, который оборудован осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха. Стерильный воздух подается в шкаф ламинарным потоком, т. е. струи воздуха перемещаются параллельно, обтекая препятствия равномерными слоями. Воздух в ламинар-бокс подается через специальные фильтры, которые очищают его от спор микроорганизмов, частичек пыли и т. д. Ток воздуха, проходя через ламинар-бокс, движется к исследователю, что позволяет освободить внутреннее пространство от спор микроорганизмов. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный лабораторный халат.

Перед работой необходимо продезинфицировать поверхности стола ламинар-бокса 96%-ным раствором этилового спирта. Затем разместить на столе необходимые для работы принадлежности, культуральные сосуды со средой и провести стерилизацию рабочего объема ламинар-бокса ультрафиолетом в течение 15–20 мин с помощью ртутно-кварцевой лампы. Приступать к работе сразу после стерилизации нельзя, следует выждать 15–20 мин для удаления оксида азота, образующегося под влиянием ультрафиолета. Непосредственно перед работой необходимо тщательно вымыть руки под струей теплой воды и обработать 70%-ным раствором этилового спирта. Инструменты необходимо обжечь над пламенем спиртовки и дать им остыть.

При работе в ламинар-боксе необходимо воздерживаться от лишних движений, периодически проводить дезинфекцию рук 70%-ным раствором этило-

вого спирта. При извлечении растительного материала избегать движения рук над открытыми культуральными сосудами. Перед открыванием и закрыванием культурального сосуда с питательной средой нужно слегка обжечь его горлышко над пламенем спиртовки. Нельзя пользоваться эксплантами, которые случайно уронили на поверхность стола. Выполнить посадку желательно как можно быстрее, сводя к минимуму время, в течение которого сосуды остаются открытыми. После посадки боковые грани чашек Петри обматывают парафильмом.

3.1.1 Получение каллуса из проростков фасоли. Семена фасоли помещают в чашку Петри (по 15 семян в одну чашку), заливают раствором хлорамина до полного погружения и оставляют на 20 мин. Затем семена промывают несколько раз стерильной дистиллированной водой, заливают стерильной водой и оставляют для набухания на 24 ч.

Семена с разрушенной оболочкой удаляют, а жизнеспособные стерилизуют повторно 6%-ным раствором хлорамина в течение 20 мин. После этого промывают их три раза дистиллированной водой (в каждой порции семена держат не менее 5 мин) и переносят в стерильные чашки Петри. Стерильным пинцетом придерживают семя и надрезают стерильным скальпелем оболочку. С помощью скальпеля и препарировальной иглы изолируют корешки (2–3 мм) и переносят в чашку Петри со стерильной дистиллированной водой. Затем корешки с помощью стерильной препарировальной иглы перемещают на поверхность агаризованной среды для индукции каллусогенеза (среда Мурасиге и Скуга + 20 г/л сахара + 100 мг/л мезоинозит + 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота + 0,2 мг/л кинетин) и слегка вдавливают в агар для обеспечения хорошего контакта со средой. В одну чашку Петри помещают 5–10 эксплантов.

3.1.2 Получение каллуса из проростков картофеля. Картофельные проростки промывают мылом под водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой. На 1 мин проростки погружают в стаканчик с этиловым

спиртом, после чего переносят в чашку Петри, заливают 6%-ным раствором хлорамина и оставляют на 10 мин. После этого стерилизующий раствор сливают и три раза промывают проростки стерильной дистиллированной водой. Проростки помещают в стерильную чашку Петри и стерильным скальпелем вырезают участки стебля длиной 5–10 мм, не захватывая междоузлия. Экспланты надрезают скальпелем в нескольких местах для появления раневого каллуса и помещают стерильным пинцетом на поверхность агаризованной среды для индукции каллусогенеза и слегка вдавливают в агар для обеспечения хорошего контакта со средой. В одну чашку Петри помещают 5–10 эксплантов.

Культивирование ведут в темноте, в термостате при температуре 26 °С в течение трех недель. Каллусные ткани рассматривают, микроскопируют и зарисовывают.

3.1.3 Получение суспензионной культуры. В асептических условиях открывают чашки Петри с полученным каллусом и переносят в колбы с питательной средой из расчета 2–3 г каллуса на 100 мл питательной среды. Используется питательная среда Мурасиге-Скуга + 20 г/л сахара + 100 мг/л мезоинозит + 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. Колбы закрывают пробками и закрепляют на лабораторном шейкере (рис. 3.1). Культивирование ведут в течение двух-четырех недель при частоте 100–120 об/мин.



Рисунок 3.1 – Лабораторный шейкер с колбами

3.1.4 Определение плотности суспензии растительных клеток. Шейкер останавливают и снимают колбу с суспензией. В асептических условиях колбу встряхивают и отбирают пипеткой несколько миллилитров суспензии. 1 мл суспензии смешивают с 2 мл 8%-ного оксида хрома и ставят на 15 мин в сушильный шкаф при температуре 70 °С. Такая обработка позволяет разрушить образовавшиеся клеточные агрегаты. Смесь пропускают 3 раза через шприц с толстой иглой для равномерного распределения клеток в суспензии. После чего ведут подсчет клеток в камере Горяева (лабораторная работа № 1). Каждый раз готовят три параллельных суспензии для подсчета. Плотность суспензии определяют каждую неделю. По результатам заполняют таблицу и строят зависимость числа клеток от времени культивирования в полулогарифмических координатах.

Продолжительность нахождения культуры в колбе, сут.	Номер суспензии	Коэффициент разбавления	Число клеток в большом квадрате счетной камеры					Общее число клеток в малых квадратах	Среднее число клеток a	Количество клеток в исходном образце N
			1	2	3	4	5			
0	1									
	2									
	3									
	Среднее значение									
7										
14										
21										

3.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Клетки формирующихся зародышей растений являются недифференцированными. Они интенсивно делятся и могут давать начало различным тканям и органам растения, т. е. являются тотипотентными. В процессе дифференциации клетка проходит три фазы: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировка.

Характерной особенностью заключительной фазы клеточного развития является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря способности клетки к делению. У зародыша формируется *меристема* – ткань, которая сохраняет способность к делению и образованию новых клеток на протяжении жизни растения. Некоторые клетки меристемы задерживаются в недифференцированном состоянии и за счет деления обеспечивают непрерывный рост растения. Другие клетки постепенно дифференцируются и образуют постоянные ткани. Существует два основных типа меристем: верхушечные (апикальные) и боковые (латеральные). Апикальные меристемы располагаются на верхушках побегов и корней и обеспечивают их рост в длину. Такой рост получил название первичного, а сами меристемы – первичных. Латеральные меристемы располагаются параллельно боковым поверхностям осевых органов и обеспечивают нарастание соответствующих органов в толщину. В процессе роста меристематическая ткань также сохраняется в некоторых частях растения: в корнях, в узлах побега, в сердцевинных лучах стебля. Активно растущие меристематические участки, расположенные большей частью у основания стеблевых междоузлий называются интеркалярной меристемой.

У растений могут возникать и новые (вторичные) меристемы. Это происходит, например, при ранении. Раневые меристемы дают начало *каллусу* – особой ткани, состоящей из паренхимных клеток, которые благодаря интенсивному делению покрывают раневую поверхность. В дальнейшем происходит дифференцировка клеток и восстановление поврежденных органов и тканей. Способность растений к образованию каллуса и последующей регенерации тканей используется в садоводстве при получении прививок и размножения растений черенкованием.

Каллусы можно получать из разных частей растения, в том числе из кончиков корней. Образование каллуса происходит в области первичных и вторичных меристем. Процесс каллусообразования зависит от размера экспланта. Оптимальная величина экспланта составляет 5–10 мм³, масса – 20–100 мг.

Многие ткани имеют физиологическую полярность, поэтому каллус лучше образуется на той стороне экспланта, которая ближе к апикальным меристемам корня (рис. 3.2). Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на среду горизонтально, тогда как сегменты стебля лучше формируют каллус, если их поместить вертикально.

Для культивирования на питательных средах лучше использовать стерильные корешки, полученные при проращивании семян в стерильных условиях.

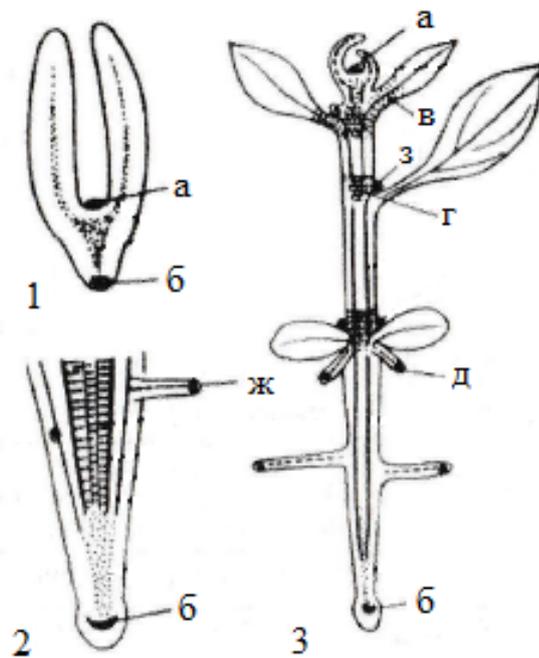


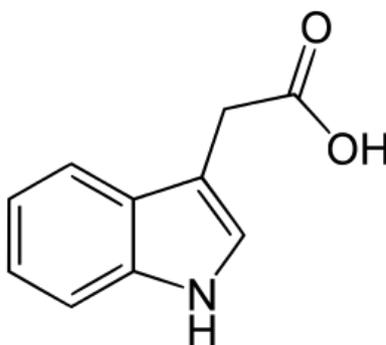
Рисунок 3.2 – Меристематические ткани: 1 – в зародыше семени; 2 – в кончике корня; 3 – в проростке растения; а – верхушечная меристема побега; б – верхушечная меристема корня; в – интеркалярная меристема листа; г – интеркалярная меристема побега; д – верхушечная меристема придаточного корня; ж – верхушечная меристема бокового корня; з – верхушечная меристема пазушной почки

Способностью к образованию каллуса обладают клетки специализированных органов и тканей растения. На начальном этапе этого процесса происходит утрата клетками ткани специализации и восстановление их способности к делению – дедифференцировка. То есть специализированные клетки как бы

вновь возвращаются в меристематическое состояние. Происходит дедифференцировка под действием фитогормонов.

Фитогормоны – синтезируемые растениями органические соединения, которые оказывают влияние на их рост и развитие. Фитогормоны представлены двумя основными классами: цитокининами и ауксинами. Ауксины инициируют процесс дедифференциации растительных клеток, а цитокинины способствуют их делению.

Природный ауксин в растениях представлен в основном в виде β -индолил-3-уксусной кислоты (гетероауксин) – ИУК:

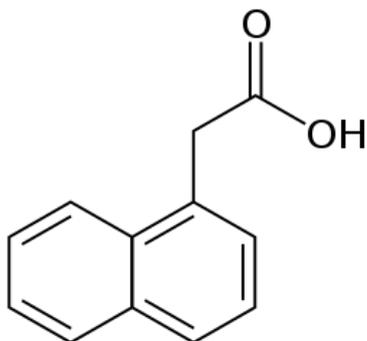


β -индолил-3-уксусная кислота (ИУК)

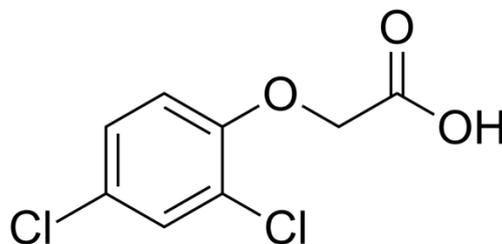
Наиболее выраженный эффект ИУК проявляется в стимуляции роста. ИУК играет важную роль в процессах регенерации при размножении каллусных клеток; в процессе образования придаточных и боковых корней, луковиц, при заложении вегетативных почек.

Для практических целей часто применяют не ИУК, а синтетические ауксины, так как не происходит их разрушение ИУК-оксидазой, присутствующей в растениях. Молекулы синтетических ауксинов содержат ароматическое кольцо, боковая часть которого представлена остатком алифатической кислоты. Это: индолил-3-масляная кислота (ИМК), α -нафтил-1-уксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксипуксусная кислота (2,4-Д), фенилуксусная кислота (ФУК), фенилмасляная кислота (ФМК). 2,4-Д применяют для индукции каллуса у злаковых, бобовых, томатов, для роста суспензионных культур. ИУК, ИМК, ФУК и

ФМК применяют в качестве индукторов для образования корней, а в сочетании с цитокининами эти фитогормоны могут быть использованы для развития проростков при культивировании изолированных зародышей.

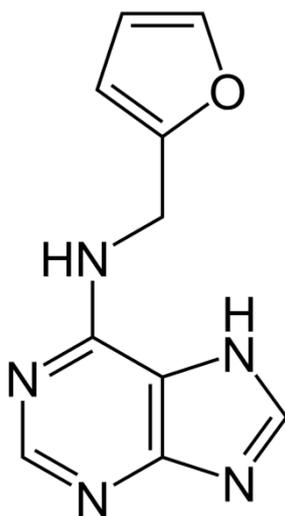


α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК)



*2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
(2,4-Д)*

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин, зеатин, которые представляют собой N-замещенные производные аденина.



Кинетин (6-фурфуриламинопурин)

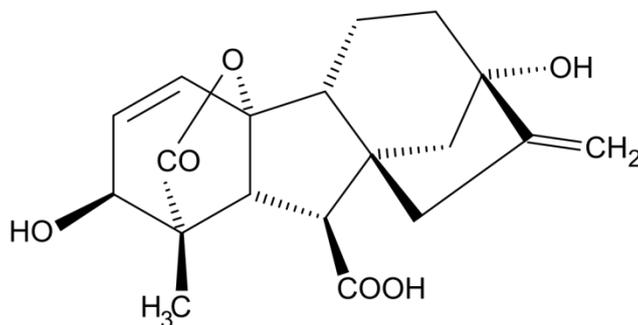
Действие цитокининов проявляется, прежде всего, в ускорении клеточных делений, что опосредуется усилением синтеза ДНК и РНК белков. Благодаря этому замедляется старение клеток и повышается их устойчивость к не-

благоприятным факторам среды. Цитокинины в составе сред включают для стимуляции клеточного деления в каллусных и суспензионных культурах, в культурах протопластов.

В качестве источников ауксинов в питательных средах обычно используют 2,4-Д- 1-10 мг/л, а также ИУК – 1- 30 мг/л, и НУК – 0,1-2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции образования каллуса обычно применяют высокие концентрации ауксинов, а при последующих пересадках ткань может расти, если содержание ауксинов в среде уменьшено в несколько раз. В качестве источника цитокининов в искусственных питательных смесях используют кинетин, 6-бензиламинопурин, зеатин (0,001-10 мг/л). Зеатин и 6-бензиламинопурин более активны в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза, чем кинетин. В состав некоторых питательных смесей входит аденин.

Помимо ауксинов и цитокининов, к классу фитогормонов относятся также абсцизины и гиббереллины. Абсцизовая кислота оказывает противодействие ауксинам, цитокининам и гиббереллинам.

Гиббереллины оказывают множественное действие: стимулируют рост в фазе растяжения и деления клеток, вызывают рост плодов. В составе культуральных сред гиббереллины поддерживают рост суспензионных культур. Для практических целей наиболее часто используют гибберелловую кислоту:



Гибберелловая кислота

Основными компонентами питательных сред для культивирования каллусной ткани являются минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник углеводного питания (сахароза), витамины и фитогормоны.

Для обеспечения нормального метаболизма растительных клеток в культуре в питательной среде должен присутствовать ряд *макро- и микроэлементов* неорганического происхождения. В соответствии с рекомендациями Международной ассоциации физиологов растений те элементы минерального питания растений, которые требуются в концентрациях, превышающих 0,5 ммоль, относятся к макроэлементам, а те, которые необходимы в более низких концентрациях – к микроэлементам. Основные макроэлементы питательной среды для культивирования растительных клеток: азот, калий, фосфор, кальций, магний и сера. Они входят в состав питательных сред в виде соответствующих солей, легко усвояемых растительными клетками. Азот присутствует в питательных средах в нитратной и аммонийной форме. В качестве дополнительных источников азота в состав питательных сред иногда вводят аминокислоты (аланин, глутаминовая кислота, глицин, аргинин и др.). Иногда смесь аминокислот заменяют гидролизатом казеина.

К основным микроэлементам питательных сред относятся двухвалентное железо, марганец, бор, медь, цинк, молибден, кобальт. Наиболее важными микроэлементами являются железо и медь, поскольку участвуют в регуляторных процессах и окислительно-восстановительных превращениях и входят в состав коферментов. Железо используется в виде хелатов ($\text{FeSO}_4 + \text{ЭДТА}$ (этилендиаминтетрауксусная кислота или ее динатриевая соль)).

Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования растительных клеток. При изолировании эксплантов они, как правило, теряют хлорофилл, поэтому культивируемые ткани не способны обеспечить себя углеводами за счет фотосинтеза. Чаще всего источником углеводов в питательных средах является сахароза в концентрации 2–3 %. Помимо сахарозы используются глюкоза, галактоза, мальтоза.

Существенную роль в культуре клеток растений играют *витамины*: тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота, рибофлавин, биотин, пантотеновая кислота, аскорбиновая кислота. Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способны синтезировать все необходимые для жизнедеятельности витамины. Но на первом этапе – при введении в культуру, обязательно добавлять витамины. Во многих питательных средах присутствует также мезоинозит, который в растениях участвует в обмене ауксина. В культуре клеток мезоинозит участвует в биосинтезе пектина, гемицеллюлозы, участвует в утилизации ионов.

Среды по консистенции бывают твердыми или агаризованными, и жидкими, в зависимости от цели исследования. Для приготовления твердых питательных сред используется агар-агар. Питательные среды содержат железо в хелатированной форме, которая обеспечивает его доступность растению. Значение pH среды влияет на стойкость и усвояемость ряда составляющих. Значение pH большинства растительных тканей лежит в пределах 5,5-5,8.

Наиболее известные, универсальные и часто используемые среды для культивирования растительных тканей – это среда Мурасиге и Скуга (МС) и ее модификации, среды Гамборга, Блейдза, Уайта, Шенка-Хильденбранта (ШХ) и др. В табл. 3.1 приведен состав питательной среды МС для индукции каллусогенеза.

Каллусную ткань возможно культивировать в суспензионном виде при пересеве ее на жидкую свежую питательную среду. Для этих целей предпочтительнее использовать рыхлую каллусную ткань, распадающуюся на отдельные клетки. Обязательным условием культивирования суспензионной культуры является постоянное перемешивание. В противном случае за счет деления клеток вместо суспензии образуется каллусная ткань.

Таблица 3.1 – Состав среды МС для индукции каллусогенеза

Компонент	Содержание, мг/л
NH_4NO_3	1650,00
KNO_3	1900,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,00
KH_2PO_4	170,00
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
КI	0,83
Na_2 -ЭДТА $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,30
H_3BO_3	6,20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80
Глицин	2,00
Тиамин-НСI	0,10
Пиридоксин-НСI	0,50
Никотиновая кислота	0,50
Мезо-инозит	100,00
Сахароза	20,00
2,4-Д	2,00
Кинетин	0,20
Агар-агар	7,00

Контрольные вопросы

- 1) Что такое меристемы? В каких частях растений они обнаруживаются?
- 2) Что понимают под тотипотентностью растительных клеток?
- 3) Что такое каллусная ткань? Каковы условия для ее образования?
- 4) Какие фитогормоны вы знаете? Назовите их функции.
- 5) Какие компоненты входят в состав питательных сред для культивирования растительных клеток?
- 6) Какие питательные среды для культивирования растительных клеток вы знаете?
- 7) Каким образом соблюдается асептика при культивировании растительных клеток? Опишите порядок работы в ламинар-боксе.
- 8) Каким образом осуществляется процесс получения каллусной ткани из проростков?
- 9) При каких условиях культивируется каллусная и суспензионная культуры растительных клеток?
- 10) Каким образом оценивается плотность суспензионной культуры растительных клеток?

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДА РАЗДЕЛЕНИЯ ОКРАШЕННЫХ ЖИДКОСТЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (5 Ч)

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по осуществлению процесса эксклюзионной хроматографии для выделения биотехнологических продуктов.

Задания:

- 1) изучить теоретический материал, представленный в разд. 5.1;
- 2) подготовить хроматографическую колонку к работе и провести разделение компонентов окрашенных биотехнологических продуктов.

4.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: хроматографическая колонка; стеклянный поршень или стеклянная палочка; стеклянная воронка; мерная пипетка объемом 1 см³.

Материалы и реактивы: окрашенные жидкости (коньяк, вино); сефадекс; фосфатный буферный раствор рН=7; дистиллированная вода; фильтровальная бумага.

Сухой сефадекс суспендируют в фосфатном буферном растворе (рН=7) и оставляют набухать в течение 3 ч при комнатной температуре.

Колонку (рис. 4.1) укрепляют на штативе строго вертикально, закрывают нижний кран-зажим (4) и наливают в нее примерно на 1/3 объема дистиллированной воды. Энергичным движением стеклянного поршня (7) освобождают пространство под диском от пузырьков воздуха. На диск с помощью поршня помещают кружок фильтровальной бумаги, по размерам точно соответствующий

ший внутреннему диаметру колонки. Поршень осторожно вынимают, следя за тем, чтобы в колонку не попали пузырьки воздуха.

Через воронку или по палочке наливают в колонку густую, тщательно взмученную взвесь используемого сорбента так, чтобы жидкость стекала по стенке колонки и не увлекала в свою толщу пузырьков воздуха. Суспензии дают осесть, через несколько минут открывают кран и продолжают наполнение колонки, постепенно подливая следующие порции взвеси. Необходимо следить за тем, чтобы наполнение колонки было равномерным.

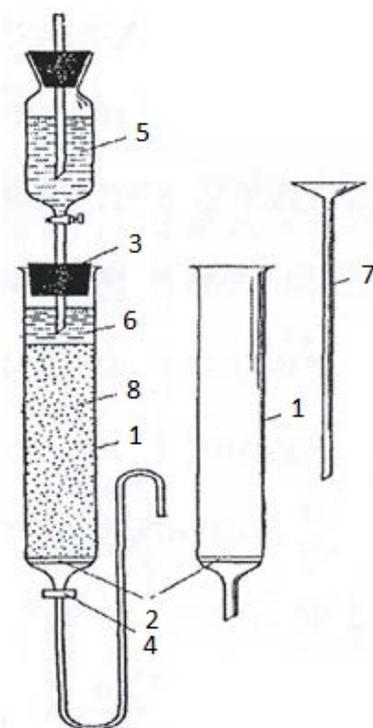


Рисунок 4.1 – Хроматографическая колонка упрощенного варианта:

1 – стеклянная колонка; 2 – перфорированный диск; 3 – пробка со стеклянной трубкой; 4 – кран-зажим; 5 – резервуар с элюентом; 6 – буферный раствор над гелем; 7 – стеклянный поршень; 8 – сорбент

Заполнив колонку до нужной высоты (3/4 колонки), закрывают нижний кран-зажим и дают суспензии осесть, не допуская высыхания наполнителя в колонке (для этого над верхним слоем сорбента всегда должен находиться слой

растворителя). Следят также за тем, чтобы верхний слой наполнителя имел гладкую горизонтальную поверхность. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя при внесении в колонку образца над ним иногда помещают кружок фильтровальной бумаги или поролон. Колонку закрывают пробкой с отводом или со стеклянной трубкой и присоединяют к резервуару, содержащему элюирующий раствор (5).

Исследуемую окрашенную жидкость в объеме 1 мл вносят в колонку. Внесение образца можно производить несколькими способами, самый простой из которых заключается в следующем: жидкость с поверхности наполнителя осторожно удаляют микропипеткой, оставляя слой в 1–2 мм, при помощи пипетки осторожно вносят образец и, открыв нижний кран, дают ему впитаться, остатки образца над сорбентом смывают небольшой порцией элюента, после того, как он впитается поверхностью наполнителя, добавляют новые порции элюирующего раствора, создавая слой высотой до 5 см.

После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, устанавливают необходимую скорость протекания элюирующего раствора путем изменения рабочего давления. Наблюдают за процессом разделения компонентов окрашенной смеси.

4.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Гель-фильтрация или эксклюзионная хроматография (ситовая, гель-проникающая, гель-фильтрационная хроматография) – разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (большей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры (рис. 4.2).

Стационарная фаза при гель-фильтрации остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует. Принципиальной особенностью метода является возможность разделения молекул по их размеру в растворе практически любых молекулярных масс.

Отличиями эксклюзионной хроматографии от других вариантов является априори известная продолжительность анализа в конкретной используемой системе, возможность предсказания порядка элюирования компонентов по размеру из молекул.

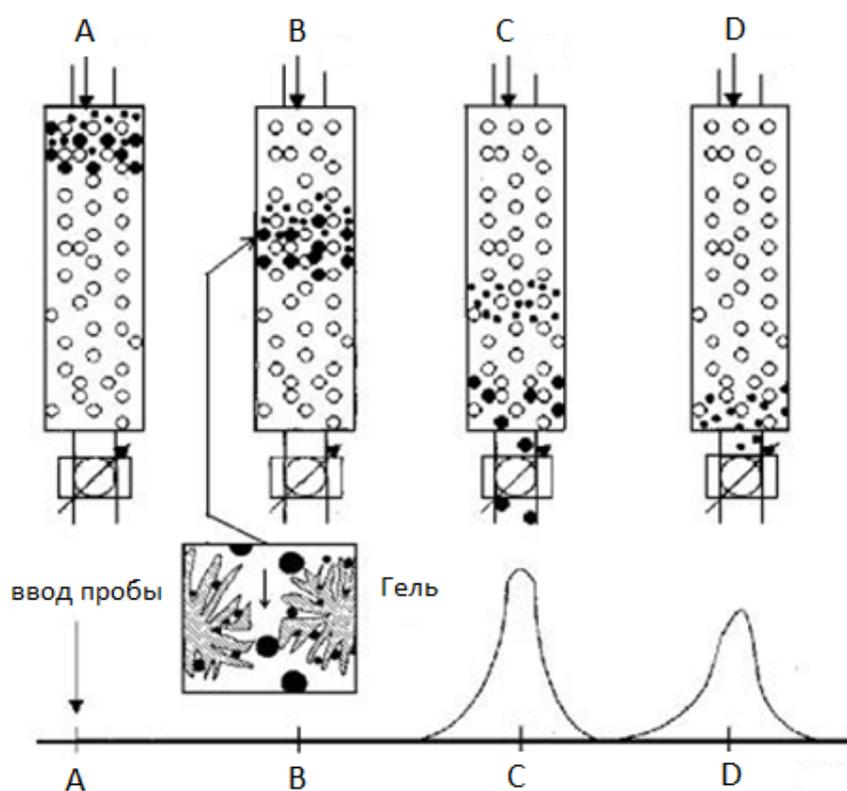


Рисунок 4.2 – Принцип разделения и детектирования пробы в эксклюзионной хроматографии: А – ввод пробы; В – разделение по размерам; С – выход крупных молекул; D – выход мелких молекул

Выбор сорбентов, обеспечивающих оптимальные условия для решения конкретной задачи, проводят в несколько этапов. Матрица геля должна быть химически инертной, т. е. в ходе эксклюзионной хроматографии не должно происходить химическое связывание разделяемых макромолекул. При разделе-

нии белков, ферментов, нуклеиновых кислот при контакте с матрицей не должна происходить их денатурация. Первоначально на основе данных о химическом составе или растворимости анализируемых веществ устанавливают, какой вариант процесса следует применить – хроматографию в водных системах или в органических растворителях, что в значительной степени определяет тип необходимого сорбента. Разделение веществ низкой и средней полярности в органических растворителях можно успешно осуществить как на полужестких, так и на жестких гелях.

Для работы в водных системах используют главным образом жесткие сорбенты; иногда очень хорошие результаты удается получить на полужестких гелях специальных типов. Затем по калибровочным кривым или данным о диапазоне фракционирования выбирают сорбент пористости с учетом имеющихся сведений о молекулярной массе образца. Если анализируемая смесь содержит вещества, отличающиеся по молекулярной массе не более чем на 2–2,5 порядка, то обычно удается разделить их на колонках с одним размером пор. При более широком диапазоне масс следует использовать наборы из нескольких колонок с сорбентами различной пористости. Ориентировочно калибровочную зависимость в этом случае получают сложением кривых для отдельных сорбентов.

К материалам для эксклюзионной хроматографии относятся гели, в том числе и декстрины с поперечными сшивками (торговое название сефадекс), агарозные гели (сефароза, биогель А, сагавак), полиакриламидный гель, полиакрилоилморфин (энзокрилгель) и полистиролы. Применяют также пористые стеклянные шарики (гранулы), известные под названием биоглас, и пористый кварц – порастил.

Декстрановые гели получают поперечным сшиванием полисахаридных цепочек декстрана эпихлоргидрином, благодаря чему растворимый в воде декстран становится водонерастворимым, сохраняя при этом свои гидрофильные свойства и способность к быстрому набуханию в водной среде. Варьируя число поперечных сшивок, удалось получить несколько различных типов сефадексов, различающихся степенью пористости частиц, что позволяет применять их для

разделения веществ с различными размерами молекул. Поскольку поперечные связи между цепочками разделены произвольно, размеры пор одного и того же геля варьируют в весьма широких пределах. Это означает, что молекулы, размер которых меньше некоторого критического, могут полностью или частично проникать внутрь частиц геля. Каждый тип сефадекса характеризуется так называемой «величиной поглощения воды», т. е. количеством воды, приходящейся на 1 г сухого сефадекса в полностью набухшем геле (табл. 4.1).

Таблица 4.1 – Характеристика различных типов сефадексов

Тип геля	Область разделения по молекулярному весу, дальтоны	Поглощение воды, г/г сухого вещества	Объем набухшего геля, см ³ /г сухого геля
G-10	До 700*	1,0	2
G-15	До 1500*	1,5	3
G-25	100–5000 1000–5000	2,5	5
G-50	500–10000 1500–30000	5,0	10
G-75	1000–50000 3000–80000	7,5	12–15
G-100	1000–100000 4000–150000	10,0	15–20
G-150	1000–150000 5000–300000	15,0	20–30
G-200	1000–200000 5000–600000	20,0	30–40

Гели сефадекса нерастворимы и стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабокислых растворах. В

сильнокислых растворах может произойти гидролиз гликозидных связей матрицы геля. Во влажном состоянии сефадекс можно стерилизовать в автоклаве при температуре 100 °С в течение 40 мин; свойства геля при этом не меняются.

Агарозные гели, приготавливаемые из агара, – это линейные полисахариды, состоящие из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Свойства гелей им придают водородные меж- и внутримолекулярные связи. Благодаря своей гидрофильной природе и почти полному отсутствию заряженных групп агарозные гели, подобно декстрановым, лишь в незначительной степени вызывают денатурацию и адсорбцию лабильных биохимических соединений. Агарозные гели, отличающиеся высокой степенью пористости, хорошо дополняют декстрановые. В отличие от последних, которые применяются для фракционирования сферических молекул, таких, как глобулярные белки с молекулярным весом порядка 800000 или произвольно свернутые полимеры (например, декстран с молекулярным весом до 200000), агарозные гели применяются для разделения молекул и частиц с молекулярным весом порядка нескольких миллионов дальтон. В связи с этим они широко используются при изучении вирусов, нуклеиновых кислот и полисахаридов.

Агарозные гели можно комбинировать с любыми водными буферами; они не разрушаются в растворах с высокой концентрацией солей, например в 7 М растворе мочевины, устойчивы в 95%-ном этаноле и при рН от 4 до 10, а иногда до 13. Диапазон рабочих температур – 0...30 °С, при более высоких температурах гель размягчается, а замораживание вызывает необратимые нарушения его структуры.

Агарозные гели обычно представляют собой густые суспензии в дистиллированной воде, содержащей какое-либо бактериостатическое вещество, например, азид натрия в концентрации 0,02 %.

Полиакриламидные гели получают путем полимеризации акриламида и метиленбисакриламида. Изменяя соотношение между этими двумя мономерами, удастся получить гели с различной степенью пористости. По своим свойствам они очень близки к декстрановым и агарозным гелям – стабильны в вод-

ных буферах в интервале значений рН от 1 до 10, практически нейтральны и обладают одинаковой способностью связывать воду. Полиакриламидные гели имеют предел молекулярной эксклюзии в диапазоне молекулярных весов 1800–400000 дальтон.

Вместо гелей в ряде случаев применяются пористые стеклянные шарики из боросиликатного стекла, пронизанные множеством соединяющихся между собой пор заданного диаметра; эти шарики имеют предел молекулярной эксклюзии от 3000 до 900000 дальтон и выполняют роль частиц обычного геля, однако обладают по сравнению с ним рядом преимуществ:

- химически инертны ко всем реагентам, за исключением фтористого водорода и сильных оснований;
- обладают исключительно четкими пределами эксклюзии и поэтому характеризуются большей разрешающей способностью и обеспечивают лучшее разделение;
- дают возможность значительно сократить время подготовки колонки, поскольку не нужно тратить время на их набухание;
- шарики не слипаются между собой, поэтому растворитель можно пропускать с большой скоростью;
- размер пор стеклянных шариков не зависит от растворителя и рН, поэтому можно использовать любые растворители любой ионной силы, что дает возможность применять их при градиентной элюции;
- легко промывать и стерилизовать.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое хроматография?
- 2) За счет чего происходит разделение смесей в процессе эксклюзионной хроматографии?

- 3) Какие требования предъявляются к сорбентам для эксклюзионной хроматографии?
- 4) Какие виды сорбентов вы знаете? Назовите их достоинства и недостатки.
- 5) Что представляет собой сефадекс? Какие типы сефадексов бывают, чем они различаются между собой?
- 6) Как устроена хроматографическая колонка?
- 7) Опишите порядок работы с хроматографической колонкой.
- 8) Для каких целей используют эксклюзионную хроматографию?

ПОЛУЧЕНИЕ ДРОЖЖЕВОГО АВТОЛИЗАТА (6 Ч)

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по получению, очистке и сушке биотехнологического продукта – дрожжевого автолизата – и оценке его качества.

Задания:

- 1) изучить теоретический материал, представленный в разд. 5.2;
- 2) осуществить автолиз дрожжей *Saccharomyces*;
- 3) осуществить очистку и сушку дрожжевого автолизата;
- 4) исследовать качество полученного дрожжевого автолизата.

5.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: термостат; центрифуга; центрифужные банки; лабораторная лиофильная сушка; тарелки для лиофильной сушки; электрическая плитка; термогравиметрический анализатор влажности; весы технические; сито; термометр; колба объемом 1 дм³ с пробкой; мерная колба объемом 200 см³; водяная баня; мерный цилиндр объемом 25 см³; коническая колба объемом 250 см³; бюретка; шпатель.

Материалы и реактивы: биомасса дрожжей *Saccharomyces*; 0,5%-ный раствор хлорида натрия; фенолфталеин; 0,1 н раствор гидроксида натрия; 37–40%-ный раствор формалина; дистиллированная вода.

5.1.1 Получение автолизата дрожжей. Биомассу дрожжей переносят на сито и промывают несколько раз водопроводной водой для удаления продуктов метаболизма и остатков питательной среды. В завершении дрожжи промывают 0,5%-ным раствором хлорида натрия для интенсификации автолиза.

Дрожжевой осадок ресуспендируют в колбе в дистиллированной воде в соотношении 1:1, закрывают пробкой. Колбу с дрожжевой суспензией помещают в термостат и выдерживают при температуре 45–50 °С в течение 2–4 сут.

По окончании процесса автолиза массу прогревают при температуре 85 °С в течение 10 мин для инактивации собственных ферментов дрожжей и прекращения автолиза.

5.1.2 Очистка дрожжевого автолизата. Для отделения целевого продукта, которым является жидкий автолизат, массу направляют на центрифугирование. Для этого переливают массу в центрифужные банки, закрывают их крышками.

Важно!

Распределять центрифугируемую массу необходимо так, чтобы все четыре загружаемые в центрифугу банки различались по массе не более чем на 0,5 г. Работа с центрифугой ведется под контролем преподавателя.

Массу центрифугируют при частоте 3500 об/мин, температуре 25 °С в течение 15 мин. После этого жидкий автолизат сливают в стакан, а осадок, представляющий собой клеточные стенки дрожжей, отбрасывают.

5.1.3 Сушка автолизата. Сушка дрожжевого автолизата осуществляется лиофильным способом. Поскольку сушка проводится в вакууме, для избегания «закипания» жидкости в результате понижения давления, необходимо предварительно заморозить автолизат при температуре минус 24 °С. Автолизат разливают в специальные тарелки слоем толщиной не более 2 см и помещают в морозильную камеру. Для подсчета выхода сухого продукта фиксируют массу пустых тарелок и тарелок с автолизатом.

Ллиофилизацию осуществляют в лабораторной сублимационной сушке в два этапа при следующих параметрах:

- основная сушка: температура $t = -20$ °С; давление $p = 0,67$ мбар, продолжительность процесса $\tau = 24$ ч;

- конечная сушка: температура $t = -55\text{ }^{\circ}\text{C}$; давление $p = 0,04$ мбар, продолжительность процесса $\tau = 6$ ч.

По окончании сушки тарелки взвешивают, автолизат извлекают шпателем и исследуют его качество.

По результатам 5.1.1–5.1.3 заполняют таблицу и рассчитывают выход сухого дрожжевого автолизата.

Масса дрожжей, направленных на автолиз: _____ г.

Номер тарелки	Масса пустой тарелки, г	Масса тарелки с автолизатом, г	Масса автолизата, г	Масса тарелки с автолизатом после высушивания, г	Масса сухого автолизата, г
1					
...					
Всего, г				Всего, г	
Выход, % к массе жидкого автолизата					
Выход, % к массе дрожжей					

5.1.4 Определение содержания влаги. Содержание воды в автолизате определяют с помощью термогравиметрического анализатора влажности (п. 2.1.1).

5.1.5 Определение содержания аминного азота. Содержание аминного азота – азота конечных аминокрупп аминокислот, пептидов и пептонов – является основным показателем качества дрожжевого автолизата. В мерную колбу объемом 200 см^3 вносят 2–5 г дрожжевого автолизата, добавляют небольшое количество воды, интенсивно встряхивают до растворения порошка. Если растворения не происходит, нагревают колбу на водяной бане. Доводят дистиллированной водой до метки. В коническую колбу отбирают 25 см^3 раствора, добавляют пять капель фенолфталеина и осторожно по каплям нейтрализуют 0,1 н раствором едкого натра до слабо-розового окрашивания. К нейтрально-

ванному фильтрату добавляют 10 см³ 37–40%-ного раствора формалина, после чего содержимое колбы вновь титруют 0,1 н раствором едкого натра. Для определения кислотности формалина проводят холостой опыт. В коническую колбу приливают 25 см³ дистиллированной воды, 10 см³ формалина и титруют 0,1 н раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до слабо-розового окрашивания. Замечают объем 0,1 н раствора щелочи, пошедшего на титрование пробы после добавления формалина. Азот конечных аминогрупп (мг/100 г) вычисляют по формуле (5.1):

$$N_{ам} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot 1,4 \cdot K \cdot V_2 \cdot 100}{m \cdot V_3}, \quad (5.1)$$

где $N_{ам}$ – содержание аминного азота, мг%; V_1 – объем 0,1 н раствора щелочи, израсходованного на титрование рабочей пробы после добавления формалина, мл; V_0 – объем 0,1 н раствора щелочи, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; V_2 – объем мерной колбы, мл; V_3 – объем пробы, взятой для титрования, мл; 1,4 – количество аминного азота, соответствующее точно 1 мл 0,1 н раствора едкого натра, мл; K – коэффициент нормальности раствора щелочи; m – масса навески порошка, г.

Сделайте вывод о содержании аминного азота в полученном автолизате и коммерческих продуктах.

5.1.6 Определение органолептических свойств автолизата. Определяют внешний вид, цвет, запах, вкус дрожжевого автолизата.

По результатам 5.1.4–5.1.6 заполняют таблицу:

Содержание воды	
Содержание формольного азота, мг%	
Внешний вид	
Цвет	
Запах	
Вкус	

5.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Дрожжевые автолизаты представляют собой массу разрушенных под воздействием собственных клеточных ферментов дрожжевых клеток, которая содержит белки, пептиды, аминокислоты, жиры, неорганические вещества. Автолизаты и гидролизаты дрожжей широко используются в пищевой промышленности в качестве вкусовых добавок и источников биологически активных веществ.

Дрожжи – источники белка, богатого незаменимыми аминокислотами. Аминокислотный состав дрожжевого белка представлен в табл. 5.1.

Таблица 5.1 – Содержание аминокислот, г/100 г сухого вещества белка

Аминокислоты	Содержание
<i>Незаменимые</i>	
Лизин	3,5–9,8
Треонин	2,5–6,0
Валин	2,7–5,9
Метионин	0,9–2,8
Триптофан	0,7–1,5
Изолейцин	2,9–6,2
Лейцин	3,5–8,5
Фенилаланин	1,9–4,6
<i>Заменимые</i>	
Тирозин	0,7–6,0
Гистидин	0,6–3,3
Аргинин	1,1–5,4
Аспарагиновая кислота	1,0
Глутаминовая кислота	8,7–14,0
Серин	1,4
Пролин	2,7
Цистин	0,5–2,3
Глицин	1,0–4,2
Аланин	1,0

Содержание свободных аминокислот в пекарских коммерческих дрожжах колеблется в пределах от 6 до 9 %, содержание же свободных аминокислот в дрожжевых автолизатах существенно выше, поскольку в процессе автолиза происходит расщепление пептидных связей белков протеазами, содержащимися в клетках. Помимо свободных аминокислот в результате автолиза образуются и более крупные фрагменты расщепленных белковых молекул – пептоны, пептиды. Содержание аминного азота в дрожжевых автолизатах составляет порядка 1,8–6,0 %. Такая конверсия белка позволяет получить препараты легкоусвояемого азотного питания.

Дрожжи богаты нуклеиновыми кислотами, преобладающей является рибонуклеиновая кислота. Соотношение РНК/ДНК в клетках составляет около 25. Коммерческие пекарские дрожжи содержат 26 % РНК от содержания белка в клетках. Концентрация белка и нуклеиновых кислот в дрожжах зависит от температуры роста. При снижении температуры ниже оптимальной наблюдается увеличение содержания белка и РНК.

Углеводы составляют от 30 до 50 % от массы сухих веществ дрожжей. Они представлены трегалозой, гликогеном, глюканом, маннаном и хитином.

Дрожжевые клетки содержат связанные и свободные липиды. Связанные липиды входят в состав клеточных структур, свободные откладываются в клетке в виде жировых включений. Количество липидов в дрожжах обычно не превышает 12 %, в том числе массовая доля свободных жирных кислот составляет 1–2 % от сухих веществ клетки. Условия культивирования, состав питательной среды и видовые особенности дрожжей во многом определяют их липидный состав. Так, снижение температуры с 30 до 15 °С приводит к увеличению количества липидов в дрожжах до 14,5 %, при этом возрастает доля непредельных жирных кислот.

Массовая доля минеральных веществ (зола) в дрожжах *S. cerevisiae* колеблется от 2 до 10 % сухих веществ клетки. В основном они представлены фосфором, калием, магнием, кальцием и серой. Эти минеральные компоненты относятся к макроэлементам. Кроме этих элементов клетки содержат большое

количество микроэлементов, среди которых следует обратить внимание на цинк, марганец, железо, медь (табл. 5.2).

Таблица 5.2 – Состав золы дрожжей (% от сухих веществ)

Элементы	Содержание
Фосфор	1,9-5,5
Натрий	До 0,1
Калий	1,4-4,3
Кальций	0,005-0,2
Магний	0,1-0,7
Алюминий	0,002-0,02
Сера	0,01-0,05
Хлор	0,004-0,1
Железо	0,005-0,012
Кремний	0,02-0,2
Молибден	0,0007
Медь	0,003
Цинк	0,0039

Дрожжи содержат водорастворимые витамины группы В, эргостерол, который под влиянием УФ лучей превращается в витамин D₂ (жирорастворимый) (табл. 5.3). Содержание эргостерола в дрожжах превышает 2 % от сухих веществ биомассы. Количество витаминов в дрожжах зависит от их генетических особенностей, от состава питательной среды и типа энергетического обмена. Аэробные дрожжи содержат больше витамина В₅ (витамин РР) и В₃ (пантотеновая кислота), анаэробные – В₁ (тиамин) и эргостерол.

Таблица 5.3 – Содержание витаминов в дрожжах, мг/100 г сухого вещества

Витамин	Содержание	
	пекарские	пивные
Тиамин	0,75–8,5	8–15
Рибофлавин	1,6–6,5	2–8
Ниацин	20–70	2–20
Пантотеновая кислота	300–500	30–100
Биотин	0,05–3,6	0,1–1,0
Инозит	200–500	–
Фолиевая кислота	210–510	2–10

Схема технологического процесса получения дрожжевого экстракта представлена на рис. 5.1. Процесс получения дрожжевого экстракта начинается с биоконверсии дрожжей с помощью собственных ферментов (автолиз) или с помощью ферментных препаратов (ферментолиз). В герметичном аппарате, оборудованном механической мешалкой и системой теплообмена для нагревания и охлаждения среды, при определенной температуре происходит гидролиз дрожжевых клеток. При традиционном автолизе дрожжей процесс протекает в течение 24–48 ч, а при применении ферментных препаратов время процесса сокращается до 16–18 ч. Следующая стадия технологии получения дрожжевого экстракта – герметичная сепарация лизата с помощью сепаратора-осветлителя, который разделяет суспензию на два потока: легкую фракцию – жидкий дрожжевой экстракт и тяжелую – клеточные стенки. Жидкий дрожжевой экстракт под напором из сепаратора поступает в соответствующий сборник, а потом для сгущения на следующую стадию процесса – в вакуум-выпарную установку. Клеточные стенки с помощью специального насоса из сборника сепаратора подаются в соответствующий сборник перед сушкой.

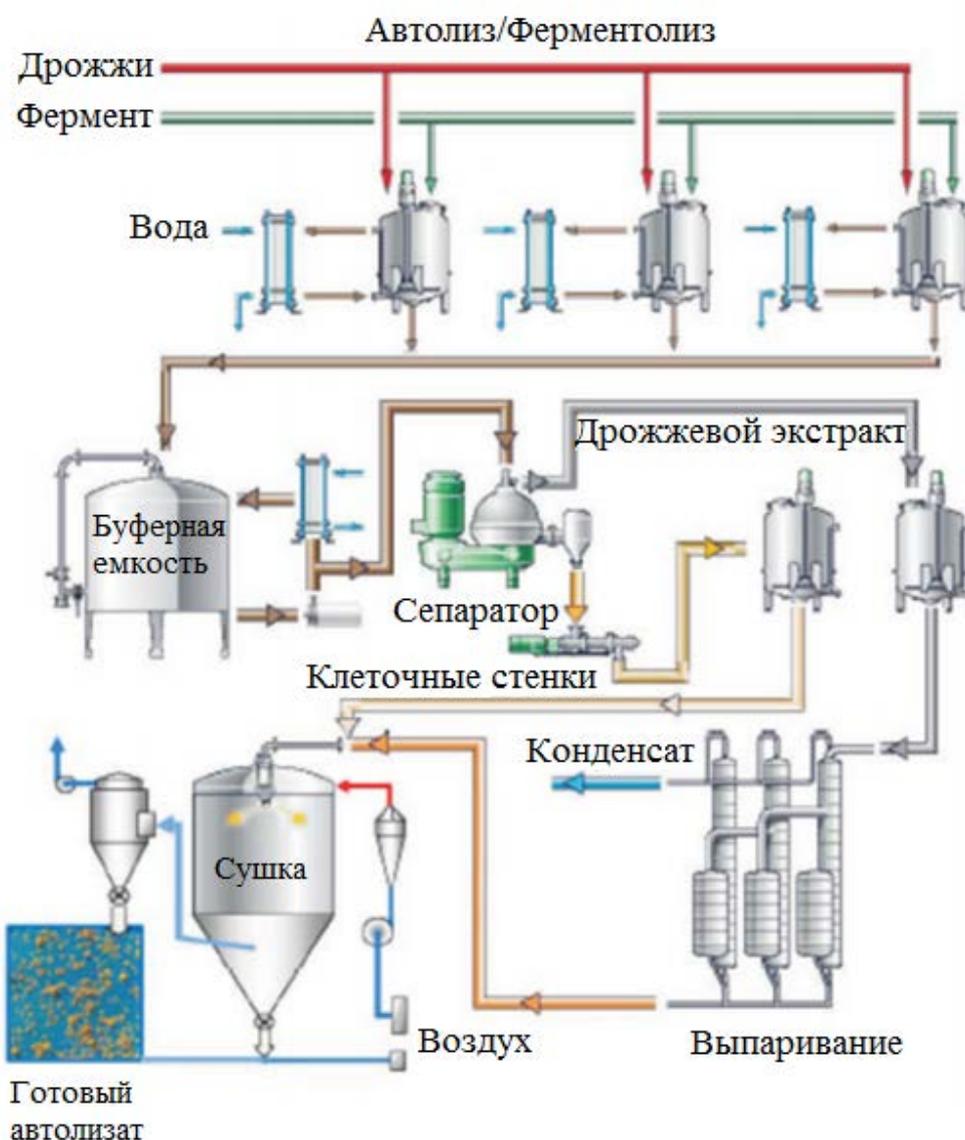


Рисунок 5.1 – Технологический процесс получения дрожжевого автолизата

В зависимости от производительности линии для сгущения жидкого дрожжевого автолизата применяют одно-, двух- или трехступенчатые вакуум-выпарные установки. Вакуум-выпарка сгущает жидкий дрожжевой экстракт при температуре 50...65 °С с концентрацией около 10 % сухих веществ (СВ) до 20–25 % СВ. Для реализации следующей стадии получения дрожжевого экстракта – сушки – применяют распылительную или лиофильную сушилку.

Ллиофильное высушивание автолизата является оптимальным способом сушки, позволяющим сохранить все биологически активные компоненты дрожжевой массы. При низкой температуре не происходит денатурация белко-

вых веществ, не протекает реакция Майяра, способствующая снижению биологической ценности белка, также сохраняются витамины. Высушивание происходит в вакуумной камере за счет возгонки растворителя. Это значит, что растворитель из твердого состояния переходит в газообразное, минуя жидкое. Устройство лиофильной сушки изображено на рис. 5.2.

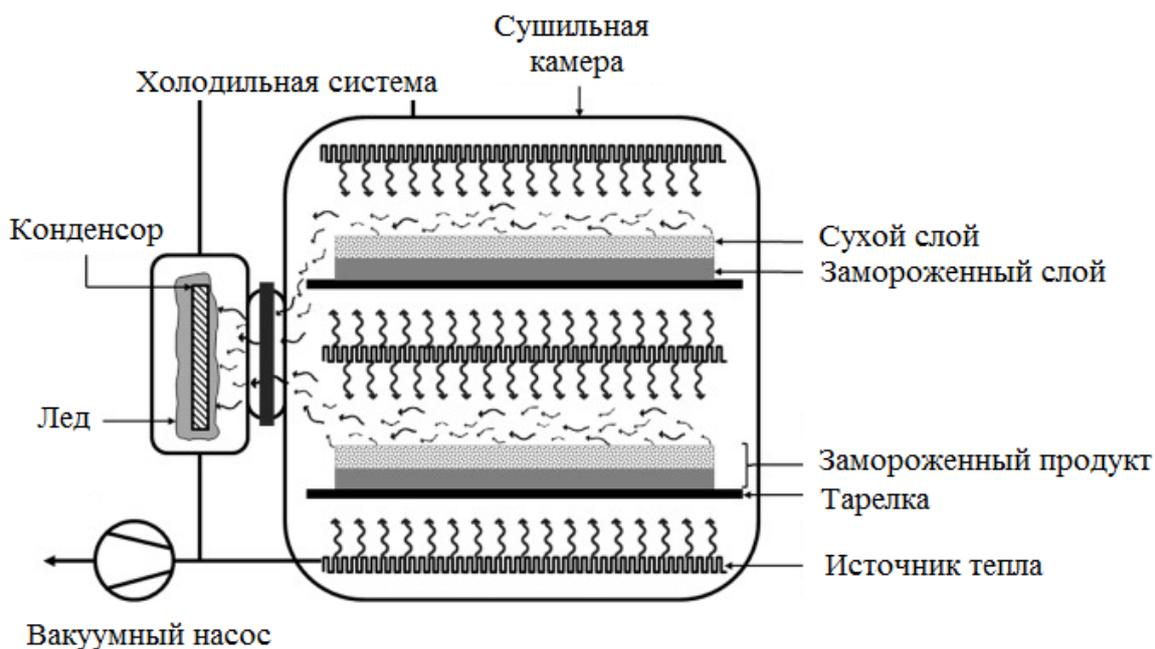


Рисунок 5.2 – Устройство лиофильной сушки

Тарелки с замороженным продуктом помещают в вакуумно-герметичную сушильную камеру. С помощью вакуумного насоса из камеры удаляются газы и достигается желаемый уровень вакуума – давление ниже 0,61 кПа. Имеющийся источник нагрева обеспечивает теплоту сублимации. Как правило, температура источника нагрева составляет 30 °С. Конденсатор собирает водяной пар, который выделяется при сублимации льда внутри продукта. Водяной пар контактирует с поверхностью конденсатора и образуются кристаллы льда.

Дрожжевой экстракт имеет солоноватый вкус и может выступать в качестве усилителя вкуса, поскольку содержит глутаминовую, гуанидиловую и инозиновую кислоты. Используется в качестве ароматизатора в производстве со-

усов, супов, полуфабрикатов, в качестве компонента биологически активных добавок к пище, в составе микробиологических питательных сред.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое автолиз? При каких условиях протекает автолиз дрожжей?
- 2) Опишите технологию получения дрожжевых экстрактов и автолизатов.
- 3) Какие витамины и минеральные вещества содержат дрожжевые клетки?
- 4) Каково содержание аминного азота в дрожжевых автолизатах?
- 5) Каким способом определяется содержание аминного азота в продукте?
- 6) В чем заключается принцип лиофильной сушки? Какими преимуществами обладает этот способ в сравнении с классической сушкой?
- 7) Охарактеризуйте органолептические свойства дрожжевого автолизата.
- 8) Охарактеризуйте физико-химические показатели дрожжевого автолизата.
- 9) Назовите области применения дрожжевого автолизата.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ И ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ (6 Ч)

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по применению ферментных препаратов в пищевой промышленности, осуществлению их иммобилизации и определению активности.

Задание:

- 1) изучить теоретический материал, представленный в разд. 6.2;
- 2) выделить ферментный комплекс из культуральной жидкости продуцента и определить его амилолитическую активность;
- 3) осуществить иммобилизацию ферментного препарата и определить его активность;
- 4) определить активность различных ферментных препаратов протеолитического действия.

6.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; термостат; центрифуга; весы технические; весы аналитические; водяная баня; стаканы объемом 100 см³; стеклянные пробирки диаметром 2 и высотой 18 см; штатив для пробирок; мерные цилиндры объемом 10 и 25 см³; конические колбы объемом 250 см³; мерная пипетка объемом 1 см³; стаканчики объемом 30 см³; шприц; мерные колбы объемом 200 см³; стеклянные воронки; бюретка; пипетки Пастера; шпатель.

Материалы и реактивы: культуральная жидкость *Bacillus subtilis* (по приложению 2); амилолитический ферментный препарат; мясной или рыбный фарш; ферментные препараты протеолитического действия; насыщенный рас-

твор сульфата аммония; 1%-ный раствор крахмала; рабочий раствор йода (по приложению 2); агар; 0,9%-ный раствор хлорида натрия; 3 М раствор хлорида натрия; фильтровальная бумага; фенолфталеин; 0,1 н раствор гидроксида натрия; 37–40%-ный раствор формалина; дистиллированная вода.

6.1.1 Выделение ферментного комплекса из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* и определение его амилолитической активности. В стакан с 50 см³ культуральной жидкости *Bacillus subtilis*, освобожденной от клеток микроорганизмов, по каплям приливают 25 см³ насыщенного раствора сульфата аммония и оставляют в покое для выпадения осадка на 1 ч. Для ускорения осаждения белка возможно помещение пробы в холодильник при температуре 4–8 °С. После формирования осадка его отделяют центрифугированием при 2700 об/мин в течение 20 мин. Полученный осадок перерастворяют в 50 см³ дистиллированной воды и определяют активность амилазы.

Для этого в две пробирки диаметром 2 и высотой 18 см приливают по 10 мл 1%-ного раствора крахмала, маркируют их и помещают в термостат при температуре 30 °С на 10 мин. Затем, не вынимая пробирки из термостата, в опытную добавляют 5 см³ раствора амилазы, а в контрольную – 5 см³ дистиллированной воды. Опытную пробирку перемешивают и выдерживают в термостате еще 10 мин. Затем из контрольной и опытной пробирок отбирают по 0,1 см³ раствора и переносят в колбы с 10 см³ рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают. Контрольный раствор приобретает синюю окраску, опытный – фиолетовую. Определяют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре, используя светофильтр с максимум светопропускания при длине волны 656 нм. Измерение ведут в кюветах с толщиной поглощающего света 0,5–1 см. Контрольным раствором при этом является вода.

Количество гидролизованного под действием амилазы крахмала определяют по формуле:

$$C = 0,1 \cdot \frac{D_1 - D_2}{D_1}, \quad (6.1)$$

где 0,1 – количество крахмала, взятого в качестве субстрата, г; D_1 – оптическая плотность контрольного раствора, соответствующая количеству исходного крахмала в субстрате; D_2 – оптическая плотность контрольного раствора, соответствующая количеству крахмала, оставшегося после действия фермента.

Сделать вывод об активности полученного препарата амилазы.

6.1.2 Получение иммобилизованного ферментного препарата и определение его активности. Навеску порошка амилолитического ферментного препарата 0,1 г растворяют в небольшом количестве теплой воды (10 см³).

В стакан вносят 0,3 г сухого агара, добавляют 10 см³ 0,9%-ного раствора хлорида натрия и оставляют набухать при комнатной температуре на 10–15 мин. После набухания стакан помещают на кипящую водяную баню и нагревают до полного растворения агара. Агар охлаждают до температуры студнеобразования (45–50 °С) и вливают в него при тщательном перемешивании раствор фермента. Полученную массу незамедлительно переносят в шприц без иглы и капают в охлажденный 3 М раствор хлорида натрия. При этом образуются плотные гранулы геля, содержащие в себе ферментный препарат. Гранулы отделяют фильтрованием и промывают 0,9%-ным раствором хлорида натрия.

Определяют активность иммобилизованного ферментного препарата по п. 6.1.1 с той разницей, что в опытную пробирку добавляют 1 г полученных гранул фермента, а в контрольную не добавляют дистиллированную воду.

Сделать вывод о сохранении амилолитической активности иммобилизованного ферментного препарата.

6.1.3 Определение активности коммерческих протеаз по интенсивности накопления аминного азота. Действие протеаз на белок животного сырья приводит к образованию низкомолекулярных продуктов, имеющих свободные аминогруппы (аминокислоты, пептиды, пептоны). Следовательно, накопление этих продуктов за определенный промежуток времени свидетельствует об интенсивности протеолиза под действием данного фермента, т. е. об его активности.

В мерные колбы объемом 200 мл переносят по 30 г мясного или рыбного фарша и по 50 см³ подогретой до 60 °С дистиллированной воды. Колбы маркируют и вносят во все, кроме одной (контроль), протеолитические ферментные препараты.

Ферментные препараты вносят из расчета 0,25 % к общей массе сырья и воды в колбе. Вначале рассчитывают необходимое количество ферментного препарата, затем в небольшой стаканчик на аналитических весах отвешивают препарат. Жидкие ферменты дозируют с помощью пипетки Пастера, сухие – с помощью шпателя. Содержимое стаканчиков переносят в мерные колбы без остатка, приливая небольшие порции жидкости из мерных колб.

Колбы помещают в термостат при температуре 50 °С (оптимальная температура для действия рассматриваемых протеиназ) на 30 мин.

Затем колбы с пробами помещают в кипящую водяную баню на 10 мин для инактивации ферментов и коагулирования белков. После нагревания колбы охлаждают под струей водопроводной воды, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в конические колбы.

В фильтратах определяют формольно-титруемый азот. Для этого в коническую колбу помещают 25 см³ фильтрата, добавляют пять капель фенолфталеина и осторожно по каплям нейтрализуют 0,1 н раствором едкого натра до слабо-розового окрашивания. К нейтрализованному фильтрату добавляют 10 см³ 37–40%-ного раствора формалина, после чего содержимое колбы вновь титруют 0,1 н раствором едкого натра.

Для определения кислотности формалина проводят холостой опыт. В коническую колбу приливают 25 см³ дистиллированной воды, 10 см³ формалина и титруют 0,1 н раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до слабо-розового окрашивания.

Замечают объем 0,1 н раствора щелочи, пошедший на титрование пробы после добавления формалина.

Азот конечных аминогрупп (мг%) вычисляют по формуле:

$$N_{\text{ам}} = \frac{(V_1 - V_2) \times 1,4 \times K \times V_3 \times 100}{m \times V_4}, \quad (6.2)$$

где V_1 – количество 0,1 н раствора щелочи, израсходованной на титрование в рабочей пробе после добавления формалина, мл; V_2 – количество 0,1 н раствора щелочи, пошедшей на титрование в холостой пробе, мл; V_3 – объем мерной колбы, мл; V_4 – объем фильтрата, взятый для титрования, мл; K – коэффициент нормальности раствора щелочи; 1,4 – количество аминного азота, соответствующее 1 мл точно 0,1 н раствора едкого натра, мл; m – масса навески мышечной ткани рыбы, г.

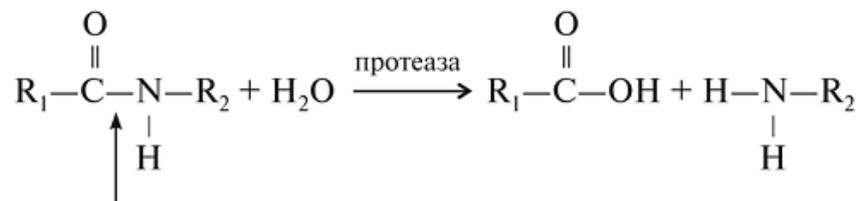
Результаты представить в виде таблицы:

Номер колбы	Наименование добавленного ферментного препарата	Оптимальные условия действия ферментного препарата	Температура гидролиза	Значение $N_{\text{ам}}$, мг %
1				
...				

Сделать вывод об эффективности гидролиза белков сырья ферментными препаратами в сравнении с контрольным образцом.

6.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Протеолитические ферменты (протеазы, протеиназы) – ферменты, обладающие способностью гидролизовать пептидные связи белка:



При гидролизе протеолитическими ферментами из белка образуются пептоны, пептиды и свободные аминокислоты. Молекулярная масса образующихся пептидов различна и зависит от типа протеазы.

Протеазы подразделяются по происхождению на микробные, животные и растительные. Животными тканями для получения протеиназ является собираемое на мясокомбинатах ферментное сырье: поджелудочная железа, слизистая оболочка желудка. Из растений промышленный интерес представляют плоды дынного дерева, побеги и листья инжира, отходы от переработки ананаса.

В зависимости от гидролизуемого ими сайта белка протеазы можно разделить на эндо- и экзопептидазы. Первые катализируют гидролиз пептидных связей внутри полипептидной цепи, образуя преимущественно мелкие пептиды и (иногда) аминокислоты. В зависимости от участвующих в катализе функциональных групп различают сериновые протеазы, цистеиновые протеазы, аспарагиновые протеазы, металлопротеазы. Экзопептидазы расщепляют пептидные связи в конце белковой цепи с образованием преимущественно свободных аминокислот и небольшого количества пептидов. Экзопептидазы разделяются на карбоксипептидазы и аминопептидазы в зависимости от того, какие (С- или N-) концевые аминокислоты отщепляются при гидролизе.

Протеиназы выпускаются промышленностью в большом количестве и находят широкое применение в пищевой промышленности. Протеиназы используются в хлебопечении для уменьшения длительности замесов при производстве заварных сортов хлеба и специальных изделий, изготавливаемых из муки с сильной клейковиной. Внесение в тесто небольших количеств протеаз

увеличивает газообразование, улучшает цвет корочки и аромат изделия. Широко применяются протеазы для устранения различного рода белковых помутнений в пивоварении и виноделии, для ускорения фильтрационных процессов. Протеолитические ферменты используют для размягчения (тендеризации) мяса, мясных изделий, рыбы, что облегчает и ускоряет обработку полупродуктов, повышает их качество. Комплексные ферментные препараты, содержащие протеиназы, используются в пищевконцентратной и консервной промышленности при приготовлении концентратов из трудноразвариваемых круп, гороха, фасоли и т. д.

Большая потребность в протеолитических ферментных препаратах связана с их использованием в составе синтетических моющих средств.

Протеолитические ферментные препараты, особенно животного происхождения, широко используются в медицинской промышленности и медицине для приготовления питательных и диагностических сред, для изготовления ряда лечебных сывороток и вакцин. Протеиназы различной степени очистки используют в качестве лекарственных препаратов для регулирования процессов свертывания крови, при лечении воспалительных процессов и т. д. Ниже приведено описание некоторых промышленно выпускаемых форм протеолитических ферментных препаратов.

Протосубтилин (производитель «Сиббиофарм», Россия) – комплексный ферментный препарат, продуцируемый микробной культурой *Bacillus subtilis*, содержит в составе комплекс нейтральных и щелочных протеаз. Наибольшую активность проявляет при значениях pH 6,0–7,0, температуре 45–55 °С.

Алкалаза (производитель Novozymes, Дания). Алкалаза представляет собой коммерческий вид фермента субтилизина. Это сериновая эндопептидаза, катализирующая гидролиз белков и пептидов, а также сложных эфиров и амидов N-защищенных аминокислот. Молекула субтилизина состоит из одной полипептидной цепи с N-концевым остатком аланина и не содержит остатков цистеина и цистина. Продуцируется генетически модифицированными микроорганизмами *Bacillus licheniformis*. Наибольшую активность фермент проявляет в диапазоне температур от 30 до 65 °С, pH – от 7,0 до 10,0.

Флаворзим (производитель Novozymes, Дания). Является комплексом грибной протеазы, продуцируемой *Aspergillus oryzae* при глубинном культивировании. Ферментный препарат проявляет активность эндопротеазы и экзопептидазы. Оптимальный диапазон pH для ферментного комплекса 5,0–7,0. Оптимум температуры составляет около 50 °С.

В пищевой промышленности не менее протеиназ востребованы другие представители класса гидролаз – амилалитические ферменты. Амилазы имеют сходную структуру и аминокислотный состав и относятся к гликогидролазам. Помимо α -амилаз в эту группу входят мальтогенная амилаза, β -амилаза, амилоглюкозидаза (глюкоамилаза), пуллуланаза и изоамилаза.

α -амилаза представляет собой эндофермент и случайным образом гидролизует α -1,4-гликозидные связи в полисахаридах с образованием низкомолекулярных декстринов. β -амилаза и амилоглюкозидаза расщепляют α -1,4-гликозидные связи с нередуцирующего конца линейных цепей молекулы крахмала, тем самым катализируя последующее выделение соответственно β -мальтозы и β -глюкозы. Действию β -амилазы препятствуют α -1,6-связи, в то время как глюкоамилаза может обходить боковые цепи и теоретически способна полностью разложить крахмал до глюкозы (рис. 6.2).

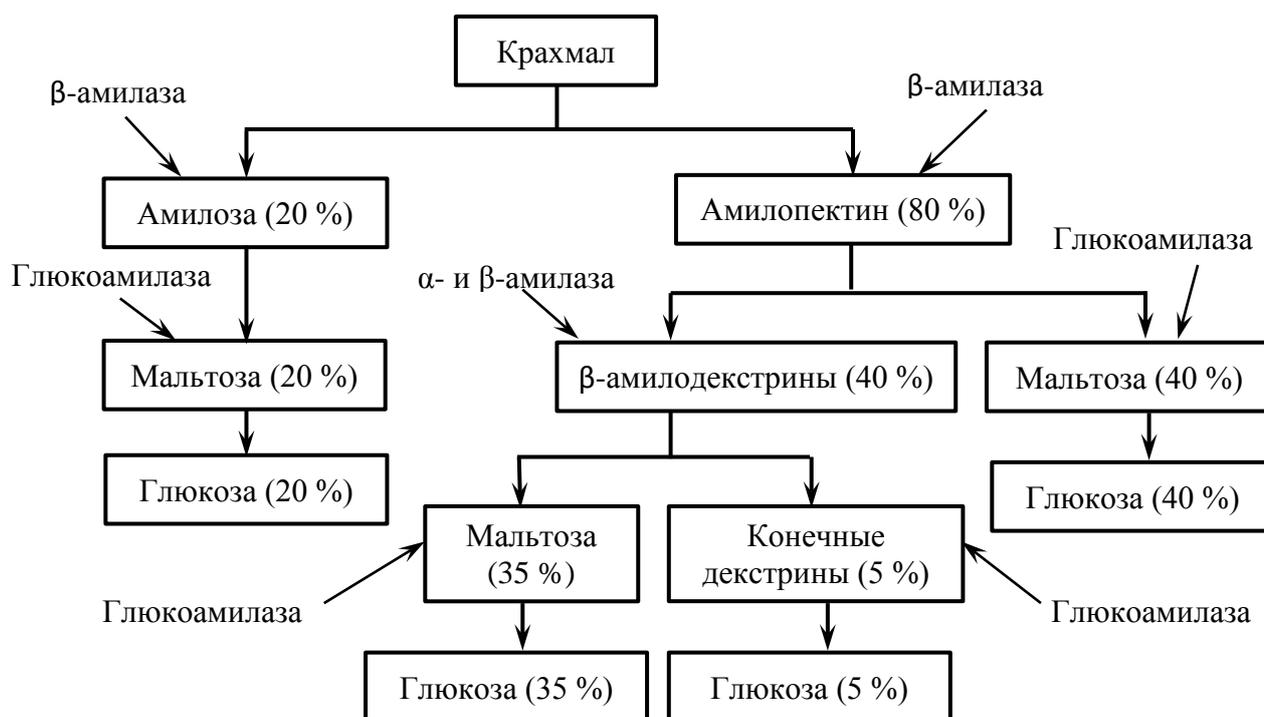


Рисунок 6.2 – Схема гидролиза крахмала гликогидролазами

Представителями промышленно выпускаемых отечественных гликогидролитических ферментных препаратов являются *Амилосубтилин ГЗх* и *Глюкаваморин*. Амилосубтилин ГЗх является комплексом α -амилаз продуцента *Bacillus subtilis*. Оптимальные условия действия препарата – температура 50–70 °С, рН 5–7. Глюкаваморин продуцируется *Aspergillus awamori* и проявляет глюкоамилазную активность. Оптимальные условия действия ферментного препарата – температура 30–60 °С, рН 4–5,5. Ферментные препараты применяются в спиртовой промышленности для снижения вязкости клейстеризованных растворов крахмала, сокращения продолжительности брожения и увеличения выхода спирта. Амилосубтилин ГЗх находит применение в составе кормов для сельскохозяйственных животных и птиц, поскольку повышает перевариваемость питательных веществ в рационах с повышенным содержанием зерна и картофеля.

Ферментные препараты различают по степени очистки и могут быть как высокоочищенными (с помощью хроматографической очистки), так и содержать весь комплекс ферментов, продуцируемых данным микроорганизмом. Наличие определенного фермента в предоставленном препарате может быть установлено по результатам катализируемой им реакции, т. е. по количеству образовавшихся продуктов или по уменьшению исходного субстрата. Стандартной единицей активности фермента принято то его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин при заданных регламентированных условиях. Часто количество субстрата нельзя выразить числом микромолей, так как точно не известна масса молекулы. В этих случаях определяют микроэквивалент затронутых реакцией групп. Так, при гидролизе белка учитывают не число прогидролизированных молекул, а число образовавшихся свободных карбоксильных или аминных групп, т. е. число расщепленных пептидных связей.

Содержание фермента в ферментном препарате условно выражается в стандартных единицах активности фермента на 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата. Активность ферментного препарата выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего в присутствии 1 мл ферментного раствора или

1 г препарата в заданных условиях за 1 мин. Если фермент гомогенен, то его удельная активность может быть выражена в стандартных единицах на 1 мг фермента; если же ферментный препарат содержит балласт в виде неактивного белка, его удельная активность выражается в стандартных единицах на 1 мг белка в ферментном препарате.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое ферменты? Какие классы ферментов вы знаете?
- 2) Какие ферменты относятся к протеиназам? На какой субстрат они действуют, какие продукты образуют?
- 3) Как классифицируют протеиназы?
- 4) Какие ферменты относятся к амилазам? На какой субстрат действуют, какие продукты образуют?
- 5) Опишите области применения протеиназ.
- 6) Опишите области применения амилаз.
- 7) Какие продуценты используют для промышленного получения гидролаз?
- 8) Каким образом осуществляется выделение ферментов из культуральной жидкости?
- 9) Что такое активность фермента?
- 10) Каким образом определяется активность протеолитических и амилолитических ферментных препаратов?
- 11) Что такое иммобилизованные ферменты?

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (5 Ч)

Цель занятия: формирование знаний о структуре нуклеиновых кислот и процессах передачи наследственной информации и практических навыков определения их концентрации в биологических объектах.

Задание:

- 1) ознакомиться с теоретическим материалом, представленным в разд. 7.2;
- 2) определить концентрацию нуклеиновых кислот в суспензии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*;
- 3) решить задачи п. 7.1.2.

7.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: спектрофотометр; центрифуга; центрифужные пробирки; мерные пипетки объемом 1 см³; мерный цилиндр объемом 10 см³; стеклянные пробирки; реторты; водяная баня; стеклянные палочки.

Материалы и реактивы: суспензия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; растворы хлорной кислоты 0,2 Н и 0,5 Н.

7.1.1 Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот в биологическом материале по фосфору. Принцип метода основан на экстракции нуклеиновых кислот (суммарного количества РНК и ДНК) хлорной кислотой при нагревании с последующим определением нуклеинового фосфора в растворе спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой области при длинах волн 270 (максимум поглощения нуклеиновых кислот) и 290 нм (максимум поглощения примесей).

В две центрифужные пробирки помещают 0,1 и 0,5 см³ суспензии клеток суточной культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, добавляют по 10 см³ 0,2 Н раствора хлорной кислоты и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Пробирки центрифугируют при частоте 3000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают. К осадкам добавляют по 10 см³ 0,5 Н раствора хлорной кислоты, пробирки закрывают ретортами и кипятят на водяной бане в течение 30 мин. Пробирки со смесью охлаждают под струей холодной водопроводной воды и центрифугируют при частоте 3000 об/мин в течение 5 мин.

Надосадочную жидкость сливают в чистые стеклянные пробирки и измеряют поглощение растворов при длине волны 270 и 290 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве контроля используют 0,5 Н раствор хлорной кислоты.

Рассчитывают концентрацию ДНК и РНК в клетках дрожжей по формуле:

$$C = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot k \cdot V}{190}, \quad (7.1)$$

где C – концентрация нуклеиновых кислот, мг/мл; E – оптическая плотность при соответствующей длине волны; k – коэффициент пересчета по фосфору нуклеиновой кислоты (для ДНК $k = 10,1$; для РНК $k = 10,5$); V – объем исследуемой пробы, мл; 190 – удельная экстинкция 1 мг фосфора нуклеиновой кислоты в 1 мл раствора.

Делают вывод о содержании ДНК и РНК в дрожжевой суспензии.

7.1.2 Задачи

а) Одна из цепей ДНК имеет последовательность

5'-АТЦГТЦГАЦГАТГАТЦАТЦГГЦТАЦТЦГА-3'

Напишите:

1) последовательность оснований в комплементарной цепи ДНК;

2) последовательность оснований в мРНК, транскрибированной с первой (данной) цепи ДНК;

3) аминокислотную последовательность соответствующей полипептидной цепи.

б) Напишите нуклеотидный состав цепи ДНК, синтезированной ДНК-полимеразой на матрице, которая представляет собой одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК со следующим нуклеотидным составом: Г 24,1 %; Ц 18,5 %; А 24,6 %; Т 32,8 %.

в) Вычислите среднюю длину (в ангстремах) и среднюю массу (в дальтонах) генов, кодирующих:

- 1) тРНК (90 мононуклеотидных остатков);
- 2) рибонуклеазу (104 аминокислотных остатка);
- 3) миозин (1800 аминокислотных остатков).

г) Известно, что длина А-Т 11,1 Å; Г-Ц 10,8 Å; расстояние между витками 3,4 Å, на один виток приходится точно 10 пар нуклеотидов, таким образом, длина одного полного витка спирали ДНК составляет 34 Å; средняя масса пары оснований 600 Да.

д) Сравните длину гена с длиной кодируемой этим геном полипептидной цепи, содержащей 150 аминокислотных остатков и находящейся полностью в α -спиральной конфигурации. Известно, что на один виток полипептидной α -спирали приходится около 3,6 аминокислотных остатка, один виток спирали занимает вдоль оси около 5,4 Å.

7.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Азотистые основания и нуклеотиды. Азотистые основания – это ароматические гетероциклические соединения, производные пиримидина или пурина. Пять соединений этого класса являются основными структурными компонентами нуклеиновых кислот, общими для всей живой материи. Пуриновые основания аденин и гуанин, а также пиримидиновое основание цитозин содер-

жатыся как ДНК, так и РНК. В состав ДНК входит также только тимин. Основание урацил входит только в состав РНК. В ДНК высших организмов в небольшом количестве присутствует 5-метилцитозин. Соединения азотистых оснований с рибозой или 2-дезоксирибозой называются нуклеозидами. Соединения азотистых оснований с рибозой (или 2-дезоксирибозой) и остатком фосфорной кислоты называются нуклеозидмонофосфатами. В случае, если присоединено два или три остатка фосфорной кислоты, то соединения называются соответственно нуклеозиддифосфатами или нуклеозидтрифосфатами (например, аденозиндифосфат (АДФ) или аденозинтрифосфат (АТФ)). Все нуклеозидфосфаты объединяют под общим названием нуклеотиды. Если фосфатная группа одного нуклеотида взаимодействует с 3'-ОН-группой другого нуклеотида, образуется динуклеотид с фосфодиэфирной связью. Такой нуклеотид несет на 5'-конце свободную фосфатную группу, а на 3'-конце – свободную ОН-группу, за счет которой возможно образование еще одной фосфодиэфирной связи и присоединение нового мононуклеотида. Таким путем образуются олигонуклеотиды и полинуклеотиды.

Полинуклеотиды, состоящие из рибонуклеотидных звеньев, называются рибонуклеиновыми кислотами (РНК), из дезоксирибонуклеиновых звеньев – дезоксирибонуклеиновыми кислотами (ДНК). При обозначении полинуклеотидов указывают сокращенные названия нуклеотидных звеньев в направлении 5'→3', т. е. слева направо. Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) обеспечивают сохранение информации, а рибонуклеиновые кислоты (РНК) принимают участие в процессах генной экспрессии и биосинтеза белка.

Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). В каждом типе ДНК содержится примерно одинаковое количество аденина и тимина. То же самое относится к гуанину и цитозину. Этот принцип называется принципом комплементарности. Напротив, соотношение (аденин + тимин) : (гуанин + цитозин) в различных организмах варьирует. Предложенная в 1953 г. модель структуры ДНК позволила объяснить причину таких соотношений: интактная ДНК состоит из двух полидезоксинуклеотидных цепей. Каждое основание одной цепи связано с ком-

плементарным ему основанием другой цепи водородными мостиками. При этом аденин комплементарен тимину, гуанин – цитозину. Таким образом, каждая пара состоит из одного пуринового и одного пиримидинового основания.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК). В отличие от ДНК, РНК не образуют двойных спиралей, но содержат короткие участки со спаренными основаниями («шпильки» и петли, образующие фигуру типа «кленового листа»).

РНК клетки существенно различаются по размерам, строению и продолжительности существования. Преобладающую часть представляют рибосомные РНК, которые в различных формах составляют структурные и функциональные части рибосом. Матричная РНК переносит генетическую информацию из клеточного ядра в цитоплазму. Транспортные РНК участвуют в процессе трансляции в качестве промежуточного связующего звена между нуклеиновыми кислотами и белками. Это небольшие молекулы РНК, состоящие из 70-90 нуклеотидов, которые с помощью своих антикодонов «узнают» определенные кодоны на матричной РНК.

Репликация, транскрипция, трансляция. Общий принцип передачи наследственной информации, названный центральным постулатом молекулярной генетики, заключается в том, что поток генетической информации направлен от ДНК через РНК к белку. Согласно центральному постулату, в хранении и передаче генетической информации принимают участие три основных процесса: во-первых, репликация – копирование ДНК с образованием идентичных дочерних молекул; во-вторых, транскрипция – процесс, в результате которого генетическая информация, заключенная в ДНК, «переписывается» в РНК с последующим переносом РНК к рибосомам; в-третьих, трансляция – процесс, в результате которого генетическая информация «переводится» на «язык» белковой структуры, в котором используется двадцатибуквенный «алфавит». Центральный постулат подтверждается не только открытием информационной (матричной) РНК, переносящей генетическую информацию от ДНК к рибосомам, где происходит синтез белка, но также данными, согласно которым имеется линейное соответствие между последовательностью нуклеотидов в гене и

последовательностью аминокислот в соответствующем белке. Одно из наиболее значительных достижений современной науки – расшифровка генетического кода, т. е. составление «словаря», в котором каждому тринуклеотидному «слову» (триплету) соответствует определенная аминокислота.

Согласно модели Уотсона-Крика молекула ДНК состоит из двух правозакрученных полинуклеотидных спиралей, имеющих общую ось, так что образуется двойная спираль. Две полинуклеотидные цепи антипараллельны, т. е. их 3',5'-фосфодиэфирные межнуклеотидные мостики ориентированы в противоположных направлениях.

Генетическая информация закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК, организованных в функциональные участки, называемые генами. Участки ДНК кодируют белки, т. е. они содержат информацию об аминокислотной последовательности белков. Каждый аминокислотный остаток представлен в ДНК своим кодовым словом (кодоном), состоящим из трех следующих друг за другом оснований. На уровне ДНК кодоны образуют ее некодирующую цепь (последовательность нуклеотидов, которой соответствует последовательность матричной РНК). Необходимо помнить, что в функциональном отношении две цепи ДНК не эквивалентны. Кодирующей цепью (матричной, смысловой) является та из них, которая считывается в процессе транскрипции. Именно эта цепь служит матрицей для РНК. Некодирующая цепь (антисмысловая) по последовательности подобна РНК (при условии замены тимина на урацил). Общепринято давать структуру гена в виде последовательности некодирующей цепи ДНК в направлении 5'→3'. Если прочитать кодоны в этом направлении, то с помощью генетического кода можно воспроизвести аминокислотную последовательность белка в принятом порядке – от N- к С-концу.

Поскольку в биосинтезе участвуют 20 аминокислот, называемых протеиногенными, «язык» нуклеиновых кислот должен содержать по крайней мере 20 слов (кодонов). Однако в аминокислотном «алфавите» имеется только четыре «буквы» (А, Г, Ц, У или Т), так что для получения 20 различных «слов» каждое

должно состоять по крайней мере из трех букв. Кодоны действительно включают три азотистых основания (триплет нуклеотидов).

В триплетном генетическом коде для 20 аминокислот потенциально существует 64 кодона. Таким образом, большинство аминокислот записывается несколькими кодонами, т. е. генетический код является вырожденным. Кроме того, имеются три триплета, которые обозначают конец транскрипции (стоп-кодона). Еще один специальный кодон, стартовый (инициирующий), маркирует начало трансляции и соответствует аминокислоте метионину.

У	Ц	А	Г	
УУУ Фен	УЦУ Сер	УАУ Тир	УГУ Цис	У
УУЦ Фен	УЦЦ Сер	УАЦ Тир	УГЦ Цис	
УУА Лей	УЦА Сер	УАА (Ochre)	УГА (Umber)	
УУГ Лей	УЦГ Сер	УАГ (Amber)	УГГ Три	
ЦУУ Лей	ЦЦУ Про	ЦАУ Гис	ЦГУ Арг	Ц
ЦУЦ Лей	ЦЦЦ Про	ЦАЦ Гис	ЦГЦ Арг	
ЦУА Лей	ЦЦА Про	ЦАА Глн	ЦГА Арг	
ЦУГ Лей	ЦЦГ Про	ЦАГ Глн	ЦГГ Арг	
АУУ Иле	АЦУ Тре	ААУ Асн	АГУ Сер	А
АУЦ Иле	АЦЦ Тре	ААЦ Асн	АГЦ Сер	
АУА Иле	АЦА Тре	ААА Лиз	<u>АГА</u> Арг	
АУГ Мет	АЦГ Тре	ААГ Лиз	АГГ Арг	
ГУУ Вал	ГЦУ Ала	ГАУ Асп	ГГУ Гли	Г
ГУЦ Вал	ГЦЦ Ала	ГАЦ Асп	ГГЦ Гли	
ГУА Вал	ГЦА Ала	ГАА Глю	ГГА Гли	
ГУГ Вал	ГЦГ Ала	ГАГ Глю	ГГГ Гли	

Рисунок 7.1 – Генетический «словарь»: Ала – алинин; Арг – аргинин;

Асн – аспарагин; Вал – валин; Гли – глицин; Глн – глутумин;

Глю – глутаминовая кислота; Гис – гистидин; Иле – изолейцин; Лей – лейцин;

Лиз – лизин; Мет – метионин; Про – пролин; Сер – серин; Тир – тирозин;

Тре – треонин; Три – триптофан; Фен – фенилаланин; Цис – цистеин

Контрольные вопросы

- 1) Что такое нуклеиновые кислоты?
- 2) Что такое нуклеотиды? Из чего они состоят?
- 3) Какие азотистые основания вы знаете?
- 4) Какую функцию выполняют ДНК и РНК?
- 5) Назовите основные различия в составе структуре ДНК и РНК.
- 6) Назовите основные процессы передачи наследственной информации.

Что происходит во время каждого из них?

- 7) Что такое генетический код?
- 8) Каким образом осуществляется кодирование генетической информации?
- 9) Опишите порядок действий при определении концентрации нуклеиновых кислот в биологическом материале.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ СРЕД С ПОМОЩЬЮ БИОИНДИКАЦИИ (6 ч)

Цель занятия: формирование знаний, умений и навыков по работе с био-объектами при определении токсичности среды.

Задание:

- 1) ознакомиться с теоретическим материалом, представленным в разд. 8.2;
- 2) определить токсичность испарений токсичных веществ и водной среды с помощью высших растений;
- 3) определить токсичность веществ с помощью тест-объектов *Daphnia magna* и *Tetrahymena pyriformis*.

8.1 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Приборы и оборудование: термостат; микроскоп; чашки Петри; конические колбы объемом 500 см³ с пробками; мерные цилиндры объемом 50 и 10 см³; стеклянные пробирки; стаканы объемом 200 см³; пинцеты; линейки; пипетки Пастера; предметные стекла.

Материалы и реактивы: семена редиса и кресс-салата; культура *Daphnia magna* или *Daphnia pulex* (по приложению 3); культура *Tetrahymena pyriformis* (по приложению 3); отстоянная водопроводная вода; сточная вода; рабочий раствор гербицида; токсичные летучие вещества (аммиак; хлороформ; ацетон и др.); растворы токсического вещества в пяти концентрациях (по приложению 3); фильтровальная бумага.

8.1.1 Биотестирование токсичности жидких сред с помощью высших растений. В чашки Петри с вложенными в них кружками фильтровальной бумаги помещают по 15 сухих здоровых семян редиса или кресс-салата, равномерно распределяя их по фильтровальной бумаге. В опытные чашки вносят по 5 мл сточной воды и рабочего раствора гербицида. В контрольные – отстоянную водопроводную воду. Все образцы помещают в термостат (20–23 °С) на 7 сут.

По истечении срока чашки открывают, осторожно пинцетом вынимают ростки и оценивают количество всходов, измеряют длину корней по корню максимальной длины, количество листиков.

Рассчитывают эффект торможения по формуле:

$$E_T = \frac{L_K - L_{оп}}{L_K} \times 100 \%, \quad (8.1)$$

где L_K – средняя длина корней контрольных образцов (мм); $L_{оп}$ – средняя длина корней опытных образцов (мм).

Усредненные для каждого теста данные вносят в таблицу вида:

Исследуемая среда	Количество всходов	Количество листков	Длина корней, мм	E_T , %
Контроль				
Сточная вода				
Раствор гербицида				

Строят диаграммы по данным таблицы.

8.1.2 Биотестирование токсичности испарений летучих веществ с помощью высших растений. На дно широкогорлых колб помещают кружочки фильтровальной бумаги, вносят по 5 см³ дистиллированной воды и помещают по 15 семян. Опытные колбы закрывают пробками, к которым подвешены кусочки ватки, смоченные токсическими летучими веществами (ацетон, аммиак,

скипидар). Контрольные колбы закрывают обычными пробками. Все образцы помещают в термостат (20–23 °С) на 3–7 сут. По истечении срока оценивают количество всходов, измеряют длину корней проростков (корень максимальной длины), длину ростков, количество листиков контрольных и опытных образцов.

Рассчитывают эффект торможения по формуле (8.1), усредненные для каждого теста данные вносят в таблицу вида:

Исследуемая среда	Количество всходов	Количество листиков	Длина корней, мм	E_T , %
Контроль				
Аммиак				
...				

Строят диаграммы по данным таблицы.

8.1.3 Биотестирование токсичных веществ с помощью низших ракообразных. При исследовании токсичности веществ тест проводят, как минимум, с пятью различными концентрациями и контрольным образцом. Для теста используют дафний в возрасте не менее 24 ч, полученных от здоровой популяции без симптомов стресса.

В пять стаканов объемом 200 см³ вносят по 50 см³ тестового раствора, а в один – 50 см³ контрольного. Затем в каждый стакан помещают по 10 дафний. Для этого пипеткой с широким концом дафний отлавливают из сосуда, в котором они выращивались, и помещают на предметное стекло. Пипеткой отсасывают жидкость и смывают их в приготовленные стаканы, используя жидкость из тех же стаканов. Вначале заселяют контрольный стакан, затем остальные стаканы в порядке возрастания концентрации исследуемого токсичного вещества.

Тест проводят при температуре от 18 до 22 °С, рекомендуемая периодичность освещения: 16 ч – свет, 8 ч – темнота. Допускается проведение теста в полной темноте, в частности, при исследовании веществ, нестабильных на свету. Во время исследования дафний нельзя кормить. Продолжительность теста – 48 ч.

По истечении 48 ч каждый тестовый сосуд проверяют на количество иммобилизованных дафний. Иммобилизованной (погибшей) считается особь, которая не начинает двигаться спустя 15 с после легкого встряхивания тестового сосуда, даже если при этом у нее двигаются антенны. Помимо этого, записывают любые аномалии в поведении дафний. Если гибель дафний в контрольном стакане превышает 10 %, то тест повторяют. Концентрация вещества считается вредной при гибели 20 %, сильно токсичной (среднелетальной) – 50 % и летальной – 100 % дафний.

Результаты вносят в таблицу вида:

Концентрация токсичного вещества	Процент иммобилизованных дафний	Наблюдения
0		
...		

8.1.4 Биотестирование токсичности среды с помощью инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Тестирование проводят при комнатной температуре, в защищенном от прямого солнечного света месте. В три пробирки вносят по 5 см³ заранее приготовленных тестовых растворов, в четвертую пробирку вносят контрольный раствор. В каждую из четырех пробирок вносят по 0,05 см³ культуры инфузорий, подготовленной по приложению 3. Пробирки встряхивают, отбирают из каждой по 0,01 см³ пробы, помещают на предметное стекло и подсчитывают количество клеток под микроскопом.

Для экспресс-оценки тестового раствора повторный подсчет клеток в 0,01 см³ проводят через 1 ч, для оценки хронического действия – через 24 и 48 ч. Помимо количества клеток, оценивают внешний вид инфузорий, их размер.

Показатель токсичности в хроническом опыте определяется по формуле:

$$K_T = \frac{B_K - B_H}{B_K^1 - B_H^1}, \quad (8.2)$$

где B_n – среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в начальный момент измерения; B_k – среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в конечный момент измерения; B_n^1 – среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в начальный момент измерения в контроле; B_k^1 – среднее количество инфузорий в поле видимости окуляра в конечный момент измерения в контроле.

Результаты опыта вносят в таблицу вида:

Раствор	Среднее количество клеток инфузорий в поле видимости окуляра			K_T	Наблюдения
	начальное	1 ч	48 ч		
...					

8.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

В настоящее время при оценке состояния окружающей среды ведущая роль отводится физическим и химическим методам экологического контроля. Их сущность сводится к сравнению загрязнения отдельных компонентов природных комплексов с ПДК (предельно допустимая концентрация) и ПДУ (предельно допустимый уровень). Однако такие методы имеют ряд недостатков, к которым относятся:

- невозможность учета в практической деятельности синергического и антагонистического действия загрязнителей;
- неразрешимость проблемы оценки влияния на токсичность загрязнений различных природных факторов;
- невозможность получения информации о вторичных эффектах действия загрязнителей, вызванных их накоплением и трансформацией.

Изучение последствий антропогенного воздействия на окружающую среду невозможно без применения приемов биологической индикации, которая дает прямую информацию о реакции организмов на стрессовые факторы.

Биоиндикация – определение биологически значимых нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ.

Основной задачей биоиндикации является разработка методов и критериев, которые могли бы адекватно отражать уровень антропогенных воздействий с учетом комплексного характера загрязнения и диагностировать ранние нарушения в наиболее чувствительных компонентах биотических сообществ. Организмы и их сообщества, жизненные функции которых тесно коррелируют с определенными факторами среды и могут применяться для их оценки, называются биоиндикаторами.

Пассивная биоиндикация – исследование у свободноживущих организмов видимых или незаметных повреждений и отклонений от нормы, являющихся признаками неблагоприятного воздействия.

Активная биоиндикация (биотестирование) – исследование тех же воздействий в стандартных условиях на наиболее чувствительные к данному фактору тест-организмы. Под биотестированием обычно понимают процедуру установления токсичности среды с помощью тест-объектов – специально отобранных и выращиваемых живых организмов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения их жизненно важных функций.

Методами биотестирования определяется присутствие в окружающей среде того или иного загрязнителя по наличию или состоянию определенных организмов, наиболее чувствительных к изменению экологической обстановки.

Преимущества методов биотестирования:

- суммируют все без исключения биологически важные данные об окружающей среде комплекса загрязнителей;
- позволяют судить о степени вредности тех или иных веществ для живой природы и человека;
- дают возможность контролировать действие многих синтезируемых человеком соединений;

- в условиях хронической антропогенной нагрузки могут реагировать на очень слабые воздействия в силу аккумуляции дозы;

- фиксируют скорость происходящих в окружающей среде изменений;

- указывают источники поступлений и места скоплений различного рода загрязнений в экологических системах и возможные пути попадания этих веществ в организм человека;

- помогают нормировать допустимую нагрузку на экосистемы, различающиеся по своей устойчивости к антропогенному воздействию;

- делают обязательным применение дорогостоящих, трудоемких физических и химических методов для измерения биологических параметров.

Биоиндикаторами могут быть живые организмы, обладающие хорошо выраженной реакцией на внешнее воздействие: различные виды бактерий, водорослей, грибов, растений, животных и т. п. Существенным свойством биоиндикаторов является чувствительность. Проявление реакции организма при незначительных отклонениях характеризуется как ранняя индикация. Часть видов, наоборот, накапливает воздействия без быстрого проявления. Такие биоиндикаторы называются аккумулятивными. Если биоиндикатор реагирует значительным отклонением жизненных проявлений от нормы, то он является чувствительным биоиндикатором.

К чувствительным биоиндикаторам относятся лишайники, мхи, почвенные и водные микроорганизмы (водоросли, бактерии, микроскопические грибы).

В роли биоиндикаторов могут использоваться пыльца растений, хвоя сосны и др.

Среди животных также выделяются группы организмов, положительно или отрицательно реагирующие на различные формы антропогенной трансформации среды (ракообразные, моллюски, личинки ручейников, поденок, веснянок).

Чувствительными биоиндикаторами могут быть как отдельные процессы в клетке и организме (изменение ферментативной активности, изменение в

пигментом комплексе), так и морфологические изменения (изменения формы и размера листовой пластины, уменьшение продолжительности жизни хвои).

Низшие ракообразные. Самым распространенным видом, используемым для токсикологических исследований в РФ и других странах мира, является *Daphnia magna* (дафния большая), но также могут использоваться и другие подходящие виды, например, *Daphnia pulex* (дафния обыкновенная). Процедура испытаний с использованием дафний не требует специального дорогостоящего оборудования, может производиться в обычном лабораторном помещении и в полевых условиях. Продолжительность испытаний – от нескольких часов до 21 сут (при необходимости получения заключений о влиянии на процессы размножения, для выявления отдаленных последствий).

Daphnia magna – мелкое ракообразное, постоянный обитатель стоячих и слабопроточных водоемов. По способу питания – активный фильтратор, питающийся взвешенным в воде планктоном и детритом. Самки достигают 3 мм в длину, а самцы – 1,5–2 мм. Конец туловища рачка имеет характерную выемку (эфиппиум), которая является видовым признаком, и которой *Daphnia magna* (рис. 8.1, б) отличается от *Daphnia pulex* (рис. 8.1, а).

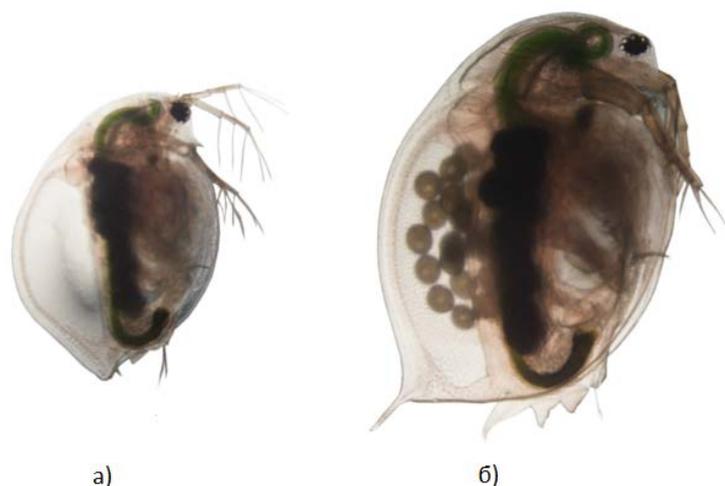


Рисунок 8.1 – *Daphnia pulex* (а) и *Daphnia magna* (б)

В природе в летнее время, а в лаборатории при благоприятных условиях – круглый год дафнии размножаются без оплодотворения – партеногенетически. Причем рождаются только самки. При резком изменении условий существования (недостаток пищи, перенаселенность, понижение температуры и т. д.) в популяции дафний появляются самцы и дафнии переходят к половому размножению, откладывая после оплодотворения «зимние яйца» (1–2 шт.), которые размещаются в эфиппие. Весной из яиц появляются самки, которые в дальнейшем вновь дают партеногенетические поколения дафний. Период созревания рачков при оптимальной температуре (20 ± 2 °C) и хорошем питании – пять-восемь дней (до 10). Наступление половозрелости отмечают по моменту выхода яйцеклеток в выводковую камеру, для чего самок просматривают в бинокляр.

В природе дафнии живут в среднем 20-25 дней, а в лаборатории при оптимальном режиме – три-четыре месяца и более. При высоких температурах (свыше 25 °C) продолжительность жизни дафний может сокращаться до 25 дней. Дафния светолюбива и концентрируется в освещенных местах.

Дафния магна устойчива к изменению кислородного режима, что связано со способностью синтезировать гемоглобин. При понижении концентрации растворенного кислорода (что является биоиндикационным признаком) у дафний наблюдается повышенное содержание гемоглобина. Они становятся ярко-красными и их численность увеличивается. При оптимальном же содержании в воде растворенного кислорода рачки становятся розовато-желтыми.

Инфузории. Для биотестирования в качестве модельных организмов широко используются инфузории тетрахимены (лат. *Tetrahymena*) видов *Tetrahymena thermophila* и *Tetrahymena pyriformis*. Тетрахимены представляют собой род преимущественно свободноживущих пресноводных ресничных инфузорий, включающий около 40 видов. В природе тетрахимены обнаруживаются среди гниющей листвы, на дне водоемов.

Tetrahymena pyriformis (рис. 8.2) – инфузории грушевидной формы, длина тела 38–60 мкм. Тело покрыто оболочкой, реснички равномерно расположены рядами от переднего (суженного) к заднему (расширенному) концу тела.

Число рядов ресничек менее двадцати. Питание осуществляется через рот (цитосом), расположенный в верхней части тела.

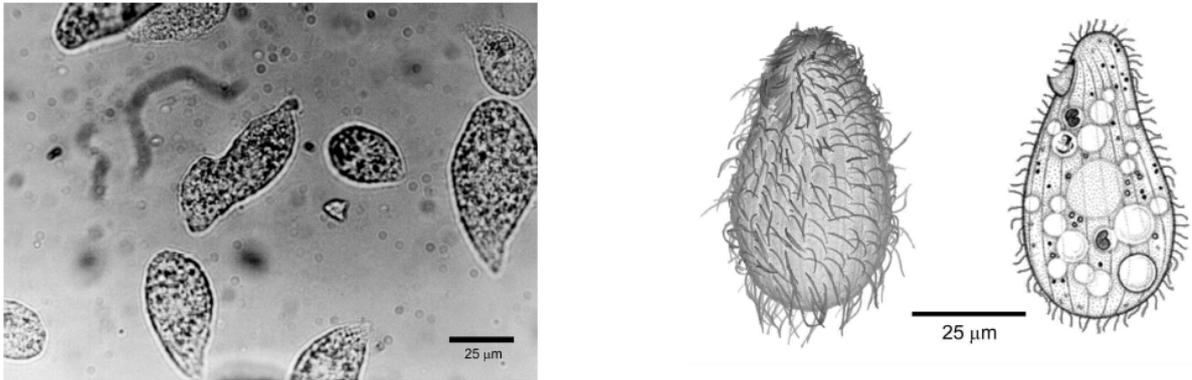


Рисунок 8.2 – *Tetrahymena pyriformis*

Бесполое размножение инфузорий осуществляется поперечным делением надвое, длительность общего цикла жизнедеятельности составляет 4–6 ч. Половой процесс носит характер конъюгации – временного соединения двух особей для взаимного обмена частями ядерного аппарата.

По отношению к содержанию растворенного в воде кислорода *Tetrahymena pyriformis* является эвриксибионтом, т. е. может существовать в широком диапазоне его концентраций – от 0 до 100 % насыщения. Температурный оптимум: 25–26 °С.

Практическое использование инфузорий *Tetrahymena pyriformis* при биотестировании объясняется их высокой чувствительностью к неблагоприятным факторам внешней среды, химическим веществам и соединениям, имеющим санитарное и экологическое значение – тяжелым металлам, канцерогенам, инсектицидам, токсинам бактерий и плесеней, фармацевтическим препаратам.

Преимуществом тетрахимен в сравнении с другими простейшими является их высокая интенсивность обмена веществ, быстрый рост. Применение тетрахимен позволяет также определить действие токсина на генетический аппарат клетки, поскольку смена поколений происходит 4–6 раз в сутки. Приблизительность обменных процессов к таковым у высших животных позволяет оце-

нивать не только токсичность сред, но и биологическую ценность пищевых компонентов.

Водоросли. Широко применяются для оценки токсичности веществ различных классов (тяжелых металлов, хлора, фосфоро- и хлороорганических соединений, поверхностно-активных веществ и др.). Метод биотестирования с применением культуры водорослей основан на определении изменения их характеристик (прироста численности параметров, флуоресценции и др.) в опытной пробе (при воздействии токсикантов) относительно контроля. Для биотестирования несоленых вод используют *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*. Для соленых – *Phaeodactylum tricornutum*.

Простейшие. *Paramecium caudatum* – массовый вид, обитающий в пресной воде с высоким содержанием органических веществ.

Высшие растения. Фитотестирование широко применяется для определения токсичности природных сред, в первую очередь почв. Фитотоксичность обычно регистрируют по изменениям в формировании корневой системы, морфологических характеристик надземной части растения, биомассе (общей и отдельных органов растения). Для определения токсичности проб предпочтительны мелкие семена с небольшим запасом питательных веществ. Так, семена редиса характеризуются высокой энергией прорастания, повышенной отзывчивостью на токсические вещества (особенно органической природы), оптимальными сроками экспозиции, поэтому они часто используются в биотестировании почв.

Бактериальные биотесты. Например, люминесцентный бактериальный тест основан на использовании в качестве тест-культуры сильно светящихся бактерий. Такие бактерии широко распространены в природе, например, род *Vibrio* (*V.harveyi*, *V.fisheri*), род *Photobacterium* (*P.phosphoreum*, *P.leiognathi*) и др. К настоящему времени методами генной инженерии получены штаммы бактерий, содержащие плазмиды, несущие гены люминесцентной системы. Измеряемым параметром является биолюминесценция в видимой области спектра. Это быстрый интегральный, чувствительный и объективный тест на загрязне-

ние окружающей среды и токсичность образцов. Это корреляция отклика на токсичность вещества с их действием на высшие организмы, недорогая и безвредная технология.

Культура клеток млекопитающих in vitro. Методика основана на регистрации изменений зависимости двигательной активности сперматозоидов животных от времени под воздействием химических агентов, содержащихся в экстракте из испытываемых проб.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое биоиндикация? Какая она бывает?
- 2) Какие биологические объекты могут использоваться для биоиндикации среды?
- 3) В чем заключается преимущество биоиндикации перед другими методами анализа токсичности?
- 4) Какие ракообразные используются для биотестирования? Опишите методику определения токсичности с помощью них.
- 5) В чем заключается преимущество использования объекта *Tetrahymena pyriformis* для биотестирования? Опишите методику определения токсичности с помощью них.
- 6) Каким образом проводится анализ токсичности с помощью высших растений?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, З. И. Исследование белков и нуклеиновых кислот: учеб. пособие / З. И. Абрамова. – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2006. – 157 с.
2. Азарова, О. П. Основы биотехнологии: метод. указания / О. П. Азарова, С. Б. Чачина. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2008. – 43 с.
3. Аксентьева, О. А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro*: учеб.-метод. пособие / О. А. Аксентьева, В. А. Петренко. – Харьков: ХНУ им. В. Н. Каразина, 2011. – 60 с.
4. Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – Москва: Элевар, 2000. – 512 с.
5. Ермишин, А. П. Биотехнология растений и биобезопасность: пособие / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова. – Минск: БГУ, 2015. – 359 с.
6. Загоскина, Н. В. Биотехнология: теория и практика: учеб. пособие для вузов / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина. – Москва: Изд-во Оникс, 2009. – 496 с.
7. Меледина, Т. В. Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья: учеб. пособие / Т. В. Меледина, В. А. Иванова, А. В. Федоров. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2017. – 60 с.
8. Меледина, Т. В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: учеб. пособие / Т. В. Меледина, С. Г. Давыденко. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.
9. Меледина, Т. В. Физиологическое состояние дрожжей: учеб. пособие / Т. В. Меледина, С. Г. Давыденко, Л. М. Васильева. – Санкт-Петербург: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 48 с.
10. Методические рекомендации по применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения. МР № ЦОС ПВ Р 005-95. – Москва, 1995. – 51 с.

11. Пестряев, В. А. Пособие для практических занятий и самостоятельной работы по нормальной физиологии / В. А. Пестряев, В. И. Баньков. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2014. – 105 с.
12. Практикум по биохимии: учеб. пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – Москва: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
13. Рабочая тетрадь для лабораторных занятий по дисциплине «Введение в биотехнологию» / сост. Ю. Ю. Филиппова. – Челябинск: Изд-во ЧелГУ, 2019. – 72 с.
14. Тулякова, Т. В. Дрожжевые экстракты – безопасные источники витаминов, минеральных веществ и аминокислот / Т. В. Тулякова, А. В. Пасхин, В. Ю. Седов // Пищевая промышленность. – 2014. – № 6. – С. 60–62.
15. Уайтхерст, Р. Дж. Ферменты в пищевой промышленности / Р. Дж. Уайтхерст, М. ван Оорт (ред.) / пер. с англ. д-ра хим. наук С. В. Макарова. – Санкт-Петербург: Профессия, 2013. – 408 с.
16. Цыренов, В. Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие: в 2 ч. / В. Ж. Цыренов. – Улан-Удэ, 2003. – Ч. 2. – 58 с.
17. Чернышева, Н. Л. Основы пищевой биотехнологии: метод. указания к лабораторным работам для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 240902.65 – Пищевая биотехнология / Н. Л. Чернышева. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВПО «КГТУ», 2011. – 55 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приготовление материалов и реактивов, необходимых для проведения лабораторных работ

Приложение 1 к лабораторной работе № 3

Приготовление среды Мурасиге-Скуга

Маточные растворы макросолей (по 1 дм³) готовят в концентрациях, в 10 раз превышающих необходимые. Хранят в стерильной посуде или в замороженном состоянии. Маточные растворы микроэлементов (по 100 см³) готовят в концентрациях, которые в 100 раз превышают необходимые, из расчета, чтобы в 1 см³ маточного раствора содержалась масса вещества, необходимая для приготовления 1 дм³ среды. Для приготовления маточных растворов каждую соль взвешивают и растворяют отдельно в новой порции дистиллированной воды. Растворы солей хранят в холодильнике.

Для приготовления раствора хелатного железа навески FeSO₄·7H₂O 557 мг и Na₂ЭДТА·2H₂O 745 мг растворяют отдельно в дистиллированной воде, сливают и доводят до кипения. Хранят в холодильнике в темной посуде.

Растворы витаминов готовят в концентрации 1 мг/см³. Растворяют в 10 см³ дистиллированной воды.

Растворы фитогормонов готовят в концентрации 1 мг/см³ следующим образом:

- цитокинины (кинетин) сначала растворяют в небольшом количестве 1 н раствора соляной кислоты;
- ауксины (2,4-Д) – в капле этанола, подогревают и добавляют соответствующий объем дистиллированной воды;
- гиббереллины растворяют в дистиллированной воде. Растворы витаминов и фитогормонов разливают по 10 см³ и хранят в морозильной камере.

Для приготовления питательной среды в колбу объемом 1 дм³ приливают 50–100 см³ дистиллированной воды и добавить необходимый объем макро- и

микросолей, хелатного железа, витаминов и фитогормонов (если входят в состав среды).

Взвешивают необходимое количество мезоинозита, сахарозы, глицина. Каждую навеску растворяют в отдельной порции воды и добавляют к смеси.

Доводят рН до 6,6–6,8 с помощью раствора 1н КОН или раствора 1н HCl.

Для приготовления агаризованной среды навеску агара помещают в термостойкую колбу или стакан, заливают холодной водой (50–100 мл), оставляют на 20 мин для набухания и нагревают, постоянно помешивая до полного растворения агара. Добавляют растворенный агар-агар к раствору среды МС и доводят до нужного объема дистиллированной водой. Среду подогревают до полного растворения всех компонентов и разливают в колбы и закрывают ватными пробками или фольгой.

Объём среды в колбе для автоклавирования не должен превышать $1/2$ – $2/3$ объема колбы. Стерилизуют среду в автоклаве при давлении 0,8–1 атм (температура 115–120 °С) в течение 20–30 мин.

Приложение 2 к лабораторной работе № 6

Приготовление рабочего раствора йода

Рабочий раствор йода готовят из основного раствора йода.

Для приготовления основного раствора йода в мерную колбу на 1 дм³ помещают 12,7 г йода и 20 г калия йодида и доводят дистиллированной водой до метки. Хранят в защищенном от света месте.

Для приготовления рабочего раствора йода к 10 мл основного раствора йода прибавляют 0,6 г калия йодида и доводят объем раствора до 100 мл. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Получение культуральной жидкости *Bacillus subtilis*

Мелко нарезанное сено (3–5 г) заливают 20–25 мл теплой водопроводной воды (35–40 °С), тщательно перемешивают и настаивают в течение 30–35 мин. Полученный таким образом экстракт фильтруют или сливают в колбу, добавляют небольшое количество карбоната кальция, закрывают ватно-марлевой пробкой и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу помещают в термостат при температуре 25–30 °С на 2–3 сут. На поверхности жидкости появляется белая пленка, состоящая из *Bacillus subtilis*. Культуральную жидкость освобождают от бактерий фильтрованием.

Приложение 3 к лабораторной работе № 8

Подготовка дафний к тестированию

В начале теста дафнии должны быть в возрасте не менее 24 ч, и для снижения изменчивости рекомендуется использовать дафний не из первого потомства. Дафнии должны быть получены от здоровой популяции без симптомов стресса, таких как высокая смертность, присутствие мужских особей и эфиппий, присутствие бесцветных особей и пр. Все организмы, используемые в отдельном тесте, получают из культур, основанных на одной и той же популяции дафний. Основная популяция должна культивироваться в условиях (освещение, температура, среда), близких к условиям проведения теста. Если питательная среда, которая будет использоваться для дафний в тесте, отличается от среды, используемой для обычного культивирования дафний, то их необходимо подвергнуть предварительной акклиматизации. Для этого дафний содержат в воде, используемой для проведения теста, при температуре теста в течение, как минимум, 48 ч до начала теста.

Культуру дафний выращивают при плотности популяции не более 25 крупных особей на 1 л воды. Кормление производят один раз в сутки одноклеточными зелеными водорослями: хлореллой и др. В виде корма можно использовать суспензию пекарских дрожжей (один-два раза в неделю), которые предварительно сильно растирают в ступке и растворяют в воде из аквариума, а также растертый и растворенный вареный желток яйца. Один раз в неделю накопившийся на дне сосуда осадок удаляют стеклянной трубкой и наполовину заменяют воду. Воздух в помещении, где выращивают дафний, должен быть без вредных выделений, так как дафнии очень чувствительны к загрязнению воздуха. Выращивают их при температуре 18–22 °С и освещении лампами в 400–600 люкс (40 ватт) в течение 8–10 ч/сут.

30–40 дафний с выводковыми камерами, полными яиц и зародышей, за трое-четыре суток до тестирования пересаживают в одно-, двухлитровые емкости (стаканы, кристаллизаторы) с аквариумной водой, в которую перед посад-

кой вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослых особей удаляют при помощи стеклянной трубки, а однодневную молодь используют для биотестирования.

Приготовление растворов токсичного вещества – лупанина

1 кг бобов алкалоидного люпина взвешивают и добавляют 5 л водопроводной воды, после чего осторожно кипятят с обратным холодильником в течение ночи. Реактор охлаждают до комнатной температуры, а воду отделяют от бобов путем декантации. Коричневую воду подщелачивают с помощью NaOH ($\text{pH} > 11$) и охлаждают до комнатной температуры, выливая в емкость, погруженную в водопроводную воду. Добавляют 2 л диэтилового эфира и энергично перемешивают смесь. Затем органическую фазу отделяют и сушат безводным сульфатом магния. Растворитель удаляют выпариванием. Полученный остаток переносят в другую колбу с помощью дихлорметана и, после удаления растворителя, получают лупанин (4–5 г) в виде твердого вещества коричневого цвета.

Готовят тестовые растворы лупанина концентрацией 2, 1, 0,5, 0,2 и 0,05 г на 1 л.

Подготовка культуры *Tetrahymena pyriformis*

Для культивирования инфузорий используют пептонно-дрожжевую и углеводно-солевою дрожжевую (УСД) питательные среды.

а) Пептонно-дрожжевая питательная среда. На 100 мл дистиллированной воды вносят 0,5 г глюкозы, 2 г пептона бактериологического, 0,1 г дрожжевого экстракта, 0,1 г морской соли. Доводят рН до 7,1 и фильтруют питательную среду через бумажный фильтр. Разливают в пробирки высотой 20 мм, закрывают ватно-марлевыми тампонами и стерилизуют в автоклаве при температуре 130 °С в течение 30 мин. Хранят в холодильнике.

б) Питательная среда УСД. На 100 мл дистиллированной воды вносят 1,5 г глюкозы, 0,1 г морской соли, 0,1 г дрожжевого экстракта. Доводят рН до 7–7,5 и фильтруют питательную среду через бумажный фильтр. Разливают в

пробирки высотой 20 мм, закрывают ватно-марлевыми тампонами и стерилизуют в автоклаве при температуре 130 °С в течение 30 мин. Хранят в холодильнике.

в) Печеночная питательная среда. Кусочек куриной печени весом 20 г отварить в 100 мл водопроводной воды, прокипятить 30 мин. Остудить, профильтровать через бумажный фильтр, разлить по пробиркам (по 5 см³). В некоторые пробирки положить кусочки печени по 5 г. Стерилизовать в автоклаве при температуре 130 °С 30 мин или дробным кипячением на водяной бане в течение 3 сут по 30 мин.

Для выращивания инфузорий в лабораторных условиях используют пептонно-дрожжевую питательную среду. Культуру инфузорий поддерживают на пептонно-дрожжевой среде путем ее пересева бактериологической петлей на свежую питательную среду через каждые 7 сут.

Поскольку инфузория *Tetrahymena pyriformis* является стерильной культурой, то ее пересевы необходимо осуществлять в условиях микробиологического бокса. При его отсутствии можно осуществлять пересев в обычном рабочем помещении с использованием спиртовки.

Температура в рабочем помещении 25±5 °С.

При отсутствии возможности частого пересева для длительной сохранности культуры можно использовать питательную среду УСД. УСД разливают в пробирки по 5 см³. Стерильной пипеткой над пламенем спиртовки вносят по одной-две капли трехсуточной культуры инфузорий, выращенных на пептонно-дрожжевой питательной среде и хранят при комнатной температуре. Инфузории остаются жизнеспособными в течение 1,5–2 мес. Хранят в затемненном месте, не допуская попадания прямых солнечных лучей.

В случае необходимости сохранения культуры сроком до 6 мес. инфузории можно культивировать на печеночной питательной среде.

Для подготовки культуры *Tetrahymena pyriformis* к анализу в конические колбы разливают пептонно-дрожжевую питательную среду толщиной слоя не более 2 см. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в ав-

токлаве в течение 30 мин при 1 атм. После остывания в колбы засевают 3–5-суточный инокулят инфузорий в количестве 0,2 мл на 10 мл пептонно-дрожжевой среды. Засеянные колбы содержат при комнатной температуре в затемненном месте в течение 2–4 сут до достижения необходимой плотности культуры.

Учебное издание

Светлана Викторовна Агафонова

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Редактор Е. Билко

Подписано в печать 29.07.2021 г. Формат 60x84 (1/16). Уч.-изд. л. 5,8. Печ. л. 6,8.

Тираж 25 экз. Заказ 54.

Издательство федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Калининградский государственный технический университет»,
236022, Калининград, Советский проспект, 1