

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Саратовский государственный аграрный университет  
имени Н.И. Вавилова»

# **БИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

краткий курс лекций

для аспирантов

Направление подготовки  
**06.06.01 Биологические науки**

Профиль подготовки  
**Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

Саратов 2014

УДК 575  
ББК 30  
Ф28

Ф28 **Биологические и биохимические основы биотехнологии:** краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)) / Сост.: Е.А. Фауст // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 95 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биологические и биохимические основы биотехнологии» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)). Краткий курс лекций содержит теоретический материал по строению и функциям клеток прокариот и эукариот, их жизненному циклу и типам клеточного деления; рассмотрены типы питания микроорганизмов, закономерности микробного роста, влияние факторов внешней среды на микроорганизмы, кинетические основы ферментативных и микробиологических процессов; генетические основы и принципы селекции микроорганизмов; биосинтетические процессы, принципы биоэнергетики, регуляторные механизмы в живых системах; молекулярные основы наследственности; принципы исследования структуры и функций гена; основы генной инженерии; принципы иммобилизации ферментов и клеток; особенности биологических мембран. Курс лекций направлен на формирование у аспирантов знаний биологических и биохимических основ биотехнологии.

УДК 575  
ББК 30

© Фауст Е.А., 2014  
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

## Введение

Биотехнология является в настоящее время одним из приоритетных направлений науки, с которым связывают благосостояние всего человечества в обозримом будущем. Биотехнология основана на генетике, молекулярной биологии, биохимии, эмбриологии и клеточной биологии, а также прикладных дисциплинах – химической и информационной технологиях и робототехнике.

Краткий курс лекций содержит теоретический материал по строению и функциям клеток прокариот и эукариот, их жизненному циклу и типам клеточного деления; рассмотрены типы питания микроорганизмов, закономерности микробного роста, влияние факторов внешней среды на микроорганизмы, кинетические основы ферментативных и микробиологических процессов; генетические основы и принципы селекции микроорганизмов; биосинтетические процессы, принципы биоэнергетики, регуляторные механизмы в живых системах; молекулярные основы наследственности; принципы исследования структуры и функций гена; основы генной инженерии; принципы иммобилизации ферментов и клеток; особенности биологических мембран.

Курс лекций направлен на формирование у аспирантов знаний биологических и биохимических основ биотехнологии.

## Лекция 1

### КЛЕТКА КАК ОСНОВА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ

#### 1.1. Строение и функции органелл клетки, химический состав клетки

В 1937-1938 г.г. Матиас Шлейден и Теодор Шванн впервые доказали, что растительные и животные организмы построены из клеток, расположенных в определенном порядке.

Клетки микроорганизмов, растений и животных построены по одинаковому принципу, хотя имеют и некоторые различия. Так, дрожжи имеют толстую *клеточную стенку* (до 400 нм), около 70% сухой массы стенки составляют полисахариды маннан и глюкан, которые обеспечивают ее механическую прочность. У бактерий основу клеточной стенки составляет гликопептид муреин.

Клеточную стенку от протоплазмы отделяет *цитоплазматическая мембрана*. Она ограничивает цитоплазму, регулирует осмотическое давление и транспорт веществ в клетку.

*Цитоплазма* – коллоидный раствор углеводов, аминокислот, ферментов, минеральных и других веществ в воде. У эукариот цитоплазма занимает 50-60% объема клетки, ее вязкость в 800 раз выше вязкости воды. В цитоплазме расположены важнейшие клеточные органеллы, в которых протекают ферментативные процессы.

*Ядро* у эукариот окружено двухслойной мембраной. Внешняя мембрана связана с эндоплазматической сетью и цитоплазматической мембраной. В ядерной оболочке имеются поры. В ядре имеется одно и более сферических образований – ядрышек, в которых хранится РНК, которая затем транспортируется в цитоплазму. Остальную часть ядра занимает хроматин, который состоит из ДНК, белка и небольшого количества РНК. В ядре локализовано более 90% всей клеточной ДНК. Главные функции ядра – хранение и передача информации дочерним клеткам.

*Митохондрии* – субклеточные структуры, которые являются энергетическим центром клетки. В них, в результате окисления органических веществ, вырабатывается АТФ – универсальный источник энергии для всех процессов в клетке. В митохондриях содержится небольшое количество ДНК, РНК и рибосом. Эти структуры обеспечивают автономный синтез белка.

*Пероксисомы* – в них локализованы ферменты, которые окисляют органические кислоты, а также ферменты антиоксидантной системы (каталаза и пероксидаза).

*Лизосомы* – в них содержится около 30 различных гидролитических ферментов, которые расщепляют макромолекулы.

*Аппарат Гольджи* – в нем белки, которые поступили из эндоплазматической сети, подвергаются различным ковалентным модификациям и приобретают свои зрелые формы. Аппарат Гольджи контролирует процессы экскреции и распределения белков по клетке, необходим для синтеза мембран.

*Эндоплазматическая сеть* – она изолирует и локализует в цитоплазме различные ферментные системы, которые катализируют синтез белков и липидов большинства клеточных органоидов. В ЭПС происходит гликозилирование белков, в результате чего они приобретают специфические функции. На ЭПС находится часть рибосом.

Для растительных клеток характерно наличие *протопластов*.

Различают три типа протопластов:

1. *Хлоропласты* – необходимы для фотосинтеза, т.е. преобразования энергии света в химическую энергию органических веществ;

2. *Лейкопласты* – характерны для клеток подземных частей растений, в них содержится ДНК и зерна крахмала;

3. *Хромопласты* – содержат более 50 видов каротиноидов, которые обуславливают окраску цветов, плодов, корней.

### **Вопросы для самоконтроля**

1) Особенности строения, химического состава и функций органелл клетки: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, ядро, митохондрии, пероксисомы, лизосомы, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, протопласты.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

#### *Основная литература*

1. Блинов, В.А. Биологические мембраны : учебно-методическое пособие / В.А. Блинов, В.И. Латышев. – Саратов : ИП «Экспресс тиражирование», 2009.

2. Коницев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1

3. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6

4. Цитология с основами патологии клетки : учебное пособие / Ю.Г. Васильев, В.М. Чучков, Т.А. Трошина. – М.: Зоомедлит, 2007. – 231 с. – ISBN 978-5-91223-002-8

#### *Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)

2. Коницев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6

3. Курбатова, Н.С. Учебное пособие по общей биологии [Электронный ресурс] / Н.С. Курбатова, Е.А. Козлова. – Саратов: Научная книга, 2012. – 160 с. – ISSN 2227-8397 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

4. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

5. Портал о генетике – <http://eguerrieri.info>

## Лекция 2

### ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КЛЕТОК И ТИПЫ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ

#### 2.1. Интерфаза, amitoz, mitoz, meioz

**Клеточный (жизненный) цикл клетки** – время существования клетки от деления до деления или от деления до ее смерти.

*Клеточный цикл включает в себя два этапа:*

1. Митоз – деление клетки.
2. Интерфаза – подготовка к следующему делению.

*По способности к делению все клетки взрослого организма подразделяются на 3 типа:*

1. Митотические – постоянно делящиеся клетки (сперматогонии).
2. Условно постмитотические клетки – неделящиеся клетки, которые сохранили способность к делению при действии определенных стимулов. Чаще всего деления возобновляются при регенерации соответствующего органа или ткани (клетки печени, стволовые клетки скелетных и мышечных тканей).
3. Постмитотические клетки – неделящиеся клетки, которые утратили способность к делению (нервные клетки; клетки сердечной мышцы и волокна скелетных мышц).

**Интерфаза** – длительный процесс, занимает не менее 90 % всего времени клеточного цикла. Во время интерфазы происходят сложные приготовления к митозу.

*Периоды интерфазы:*

1. Постмитотический (пресинтетический)  $G_1$  (от. англ. *gap* – промежуток) – длится от 10 часов до нескольких суток; возобновляются интенсивные биосинтетические процессы, которые резко замедлились во время митоза; накапливается энергия в виде АТФ; интенсивно синтезируется РНК и белки; увеличивается количество рибосом, митохондрий; клетка растет и готовится к удвоению ДНК.
2. Синтетический  $S$  – продолжается синтез белка; клетка удваивает количество ДНК (репликация хромосом); продолжительность периода – 6-8 часов.
3. Постсинтетический (премитотический)  $G_2$  – накапливается энергия; затухают все синтетические процессы; меняется вязкость цитоплазмы; прекращается выполнение клеткой основных функций; накапливаются белки для построения ахроматинового веретена; удваиваются центриоли.

Соматические клетки размножаются митозом и amitozом, половые – meioзом.

Некоторые клетки после деления дифференцируются. **Дифференциация** – это структурно-функциональная специализация клетки. После дифференциации клетки вступают в  $G_0$ -период, в котором они функционируют в течение всей своей жизни и не готовятся к делению (нервные клетки, мышечные клетки сердца).

**Митоз** (от греч. *mitos* – нить. Подразделяют на шесть стадий: первые пять стадий (профаза, прометафаза, метафаза, анафаза, телофаза) составляют собственно митоз и осуществляются в строго определенном порядке, шестая стадия – цитокинез – начинается во время анафазы и продолжается до конца митотического цикла.

Митозом делятся малодифференцированные клетки. Во время митоза клетка не выполняет свои функции.

Продолжительность митоза зависит от вида организма, типа ткани, физиологического состояния клетки, внешних условий и колеблется от нескольких минут до 2-8 часов. При повышении температуры среды скорость деления ядра возрастает за счет более быстрого прохождения самых длительных стадий – профазы и телофазы.

#### **Фазы митоза:**

**1. Профаза.** Хромосомы спирализуются и конденсируются. Приобретают базофильные свойства и полностью окрашиваются основными красителями (метиленовый синий, кристаллический фиолетовый, основной фуксин и др.). В конце профазы они начинают раскручиваться. В каждой из них становятся заметными хроматиды. Центриоли расходятся к полюсам клетки. В конце профазы цитоплазматические микротрубочки, составляющие часть интерфазного цитоскелета, распадаются, и начинается образование веретена. Веретено представляет собой двухполюсную структуру, состоящую из микротрубочек и связанных с ними белков. Сборка веретена происходит сначала вне ядра.

**2. Прометафаза.** Начинается с быстрого распада ядерной оболочки на мелкие мембранные пузырьки. Эти пузырьки остаются видимыми около веретена во время митоза. Микротрубочки веретена, которые находились вне ядра, проникают в ядерную область. У хромосом на каждой центромере образуются особые белковые комплексы – кинетохоры. Они прикрепляются к некоторым из микротрубочек веретена – кинетохорные микротрубочки. Остальные микротрубочки веретена называют полюсными, а те, которые лежат вне веретена, – астральными. Кинетохорные микротрубочки идут в противоположных направлениях от двух сестринских хроматид каждой хромосомы и тянут их в разные стороны. Это приводит к интенсивному движению хромосом.

**3. Метафаза.** Завершается образование митотического аппарата. Хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости веретена, образуя метафазную пластинку хромосом (материнскую звезду).

**4. Анафаза.** В митотических хромосомах хроматиды одновременно теряют связь друг с другом в области центромер и синхронно начинают перемещаться к полюсам делящейся клетки. Все хроматиды движутся с одинаковой скоростью – около 1 мкм/мин. Анафаза длится несколько минут.

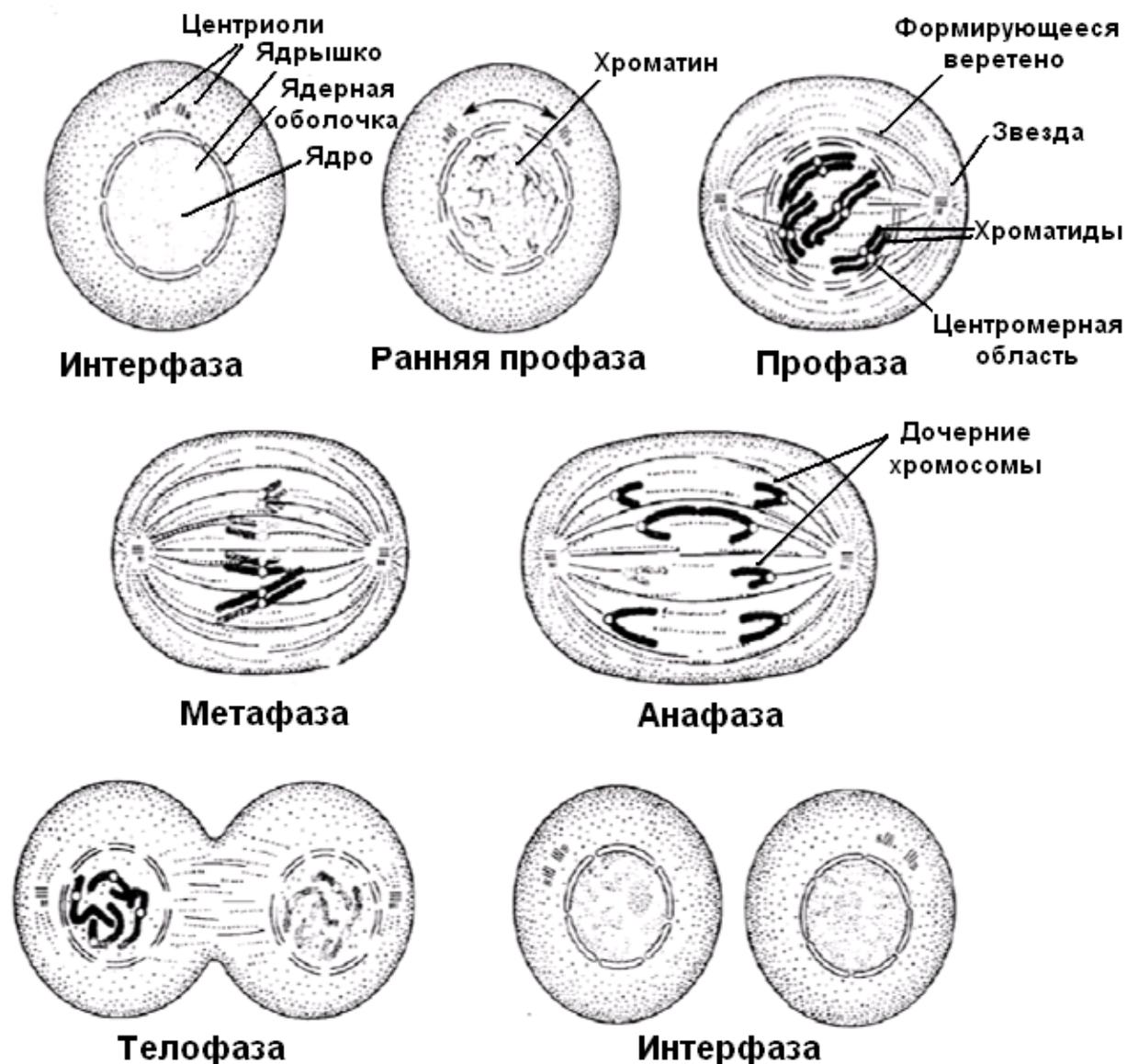
**5. Телофаза** (от греч. *telos* – конец). Разделившиеся дочерние хроматиды подходят к полюсам и кинетохорные микротрубочки исчезают. Полярные микротрубочки продолжают удлиняться. Затем вокруг каждой группы дочерних хроматид образуется новая ядерная оболочка. Конденсированный хроматин начинает разрыхляться, появляются ядрышки и митоз заканчивается.

*Биологическое значение митоза:* в результате митоза материальные носители наследственности (молекулы ДНК, входящие в состав хромосом) строго равномерно распределяются между дочерними клетками. Благодаря этому обеспечивается их наследственное сходство.

**Цитокинез** – процесс деления цитоплазмы, начинается приблизительно в анафазе. У растительной клетки происходит путем внутриклеточного образования клеточной перегородки, а у клеток животных – путем перетяжки, впячивания плазматической мембраны внутрь клетки. Для деления клетки по экватору

формируется актомиозиновое кольцо, которое постепенно сжимается, стягивая за собой плазмолемму и образуя перетяжку все уменьшающегося диаметра.

**Схематическое изображение митоза в животных клетках:**



**Амитоз (прямое деление).** При амитозе популяция клеток увеличивается путем перетяжки ядра на две равные или неравные части, а затем клетка делится. Компоненты клетки, в том числе и ДНК, распределяются произвольно. При этом не всегда обеспечивается равнонаследственное распределение генетического материала между образующимися клетками. Амитоз характерен для одноклеточных организмов, а также для некоторых высокоспециализированных, стареющих и отмирающих клеток (ткани растущего клубня картофеля, клетки печени и роговицы глаза). *Биологическое преимущество амитоза* – делящаяся клетка продолжает функционировать и завершает процесс деления быстрее, чем при митозе.

**Мейоз** (от греч. *meiosis* – уменьшение) – особый тип клеточного деления. Характерен для организмов, которые размножаются половым путем. Сущность мейоза – из одной материнской клетки с диплоидным набором хромосом возникают 4 гаплоидные клетки (гаметы или споры).

Мейоз включает два последовательных деления клеточного ядра:

1. *Редукционное* – сопровождается уменьшением (редукцией) числа хромосом вдвое;
2. *Эквационное* (уравнительное) – при этом клетки сохраняют гаплоидный набор хромосом.

В каждом из них различают те же стадии, что и в митозе: профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу.

Первому делению предшествует *интерфаза*. При этом удваивается количество ДНК. В результате каждая хромосома становится двуххроматидной. Иными словами в каждом таком ядре перед мейозом содержится эквивалент четырех наборов гомологичных хромосом. Поэтому для образования гамет с гаплоидным набором хромосом необходимы два ядерных деления. В каждом из них число хромосом уменьшается вдвое.

**Общая схема мейоза:**



***Первое мейотическое деление (редукционное):***

*Профаза I* – происходит сближение гомологичных хромосом и их попарное соединение – конъюгация. Так, в некоторых точках четыре хроматиды двух гомологичных хромосом связаны настолько прочно, что во время последующего их расхождения в этих точках происходит разрыв и обмен отдельными участками хроматид. Это явление получило название кроссинговер. После кроссинговера расходятся уже измененные хромосомы. Поэтому дочерние организмы никогда не представляют собой точную копию одного из родителей, а лишь бывают в той или иной мере на них похожи.

В конце профазы I разрушаются ядерная оболочка и ядрышко; формируется ахроматиновое веретено; гомологичные хромосомы попарно начинают перемещаться к центру клетки.

*Метафаза I* – конъюгированные хромосомы располагаются на нитях веретена деления по экватору таким образом, что центромеры гомологичных хромосом обращены к разным полюсам клетки.

*Анафаза I* – гомологичные хромосомы, каждая из которых состоит из двух хроматид, расходятся к полюсам клетки. На каждом полюсе собирается гаплоидный набор хромосом.

*Телофаза I* – восстанавливаются ядерная оболочка и ядрышко. Затем материнская клетка делится на две дочерние.

После окончания первого мейотического деления наступает короткий промежуток – *интеркинез*, в течение которого не происходит репликация ДНК и удвоение хроматид.

***Второе мейотическое деление*** – следует сразу после первого и сходно с обычным митозом:

*Профаза II* – непродолжительна.

*Метафаза II* – хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости клетки.

*Анафаза II* – происходит разделение центромер и каждая хроматида становится самостоятельной хромосомой.

*Телофаза II* – завершается расхождение сестринских хроматид к полюсам и наступает деление клетки. В результате из двух гаплоидных клеток образуется четыре гаплоидные дочерние клетки.

Благодаря мейозу поддерживается определенное и постоянное число хромосом во всех поколениях каждого вида растений и животных. Он способствует увеличению наследственной изменчивости организмов благодаря различным комбинациям хромосом в дочерних наборах. Так, число возможных комбинаций пар хромосом равно  $2^n$ , где  $n$  – число хромосом в гаплоидном наборе вида. Этим объясняется наличие половых клеток, которые несут различные признаки у одного организма, и обеспечивают разнообразие потомства.

## **2.2. Сравнительная характеристика эукариотической и прокариотической клетки**

Клетки прокариот (от греч. pro - до, kation - ядро) не имеют оформленного ядра. Иными словами, генетический материал (ДНК) прокариот находится прямо в цитоплазме и не окружен ядерной мембраной. У эукариот (от греч. eu - настоящий, истинный, kation - ядро) имеется настоящее ядро, т. е. у них генетический материал окружен двойной мембраной (ядерной оболочкой) и образует вполне определенную клеточную структуру, которую очень легко узнать.

Прокариоты отличаются от эукариот и по целому ряду других признаков.

<i>Характеристика</i>	<i>Прокариоты</i>	<i>Эукариоты</i>
Размеры клеток	Диаметр в среднем составляет 0,5–5 мкм	Диаметр обычно до 40 мкм; объем клетки, как правило, в 1000–10 000 раз больше, чем у прокариот
Форма	Одноклеточные или нитчатые	Одноклеточные, нитчатые или истинно многоклеточные
Генетический материал	Кольцевая ДНК находится в цитоплазме и ничем не защищена. Нет истинного ядра или хромосом. Нет ядрышка	Линейные молекулы ДНК связаны с белками и РНК и образуют хромосомы внутри ядра. Внутри ядра находится ядрышко
Синтез белка	70S-рибосомы и мельче. Эндоплазматического ретикулума нет. (Синтез белка характеризуется и многими другими особенностями, в том числе чувствительностью к антибиотикам; например, развитие прокариот ингибируется стрептомицином.)	80S-рибосомы (крупнее). Рибосомы могут быть прикреплены к эндоплазматическому ретикулуму
Органеллы	Органелл мало. Ни одна из них не имеет оболочки (двойной мембраны).  Внутренние мембраны встречаются редко; если они есть, то на них обычно протекают процессы дыхания или фотосинтеза	Органелл много. Некоторые органеллы окружены двойной мембраной, например ядро, митохондрии, хлоропласты Большое число органелл ограничено одинарной мембраной, например аппарат Гольджи, лизосомы, вакуоли, микротельца, эндоплазматический ретикулум и т. д.
Клеточные стенки	Жесткие, содержат полисахариды и аминокислоты. Основной упрочняющий компонент – муреин	У зеленых растений и грибов клеточные стенки жесткие и содержат полисахариды. Основной упрочняющий компонент клеточной стенки растений – целлюлоза, у грибов – хитин
Жгутики	Простые, микротрубочки отсутствуют. Находятся вне клетки (не окружены плазматической мембраной). Диаметр 20 нм	Сложные, с расположением микротрубочек типа 9 + 2. Располагаются внутри клетки (окружены плазматической мембраной). Диаметр 200 нм
Дыхание	У бактерий происходит в мезосомах; у синезеленых водорослей – в цитоплазматических мембранах	Аэробное дыхание происходит в митохондриях
Фотосинтез	Хлоропластов нет. Происходит в мембранах, не имеющих специфической упаковки.	В хлоропластах, содержащих специальные мембраны, которые обычно уложены в ламеллы или граны
Фиксация азота	Некоторые обладают этой способностью	Ни один организм не способен к фиксации азота

### 2.3. Сравнительная характеристика растительной и животной клетки

Признак	Растительная клетка	Животная клетка
Способ питания	Автотрофный (фототрофный, хемотротрофный). Способны получать органические вещества из неорганических (фотосинтез).	Гетеротрофный (хемотротрофный, сапротрофный, паразитический). Не способны самостоятельно производить органические вещества.
Способ хранения питательных веществ	В клеточном соке вакуоли	В цитоплазме в виде клеточных включений
Основной запасной углевод	Крахмал – твердое нерастворимое в воде вещество	Гликоген – быстрорастворимое в воде вещество
Синтез АТФ	В хлоропластах и митохондриях	В митохондриях
Расщепление АТФ	В хлоропластах и всех частях клетки, где тратится энергия	Во всех частях клетки, где тратится энергия
Деление	Между дочерними клетками образуется перегородка	Между дочерними клетками образуется перетяжка
Клеточный центр	Только у низших растений.	Есть клеточный центр с центриолями.
Центриоли	Только у низших растений	Есть центриоли
Клеточная стенка	Клетка покрыта целлюлозной клеточной стенкой, которая расположена снаружи от мембраны. Толстая плотная стенка сохраняет постоянную форму клетки.	Клетка лишена плотной оболочки и может менять свою форму.
Пластиды	Хлоропласты (зеленые, содержат пигмент хлорофилл), хромопласты (содержат пигменты других цветов) и лейкопласты (бесцветные).	Нет пластид.
Вакуоли	Немногочисленные крупные полости. В зрелых клетках обычно одна центральная вакуоль. Заполнены клеточным соком – водным раствором запасных веществ и конечных продуктов обмена. Назначение – осмотические резервуары, запас питательных веществ, тургорное давление.	Многочисленные мелкие полости. Назначение – сократительные, пищеварительные, выделительные.
Включения	Запасные питательные вещества: зёрна крахмала и белка, капли масла, кристаллы солей. Вакуоли с клеточным соком.	Запасные питательные вещества: зёрна гликогена и белка, капли жира, кристаллы солей, пигменты. Конечные продукты обмена веществ.

#### Вопросы для самоконтроля

- 1) Клеточный (жизненный) цикл клетки
- 2) Этапы клеточного цикла клетки.
- 3) Типы клеток взрослого организма по способности к делению.
- 4) Интерфаза.
- 5) Периоды интерфазы.

- 6) Дифференциация клеток.
- 7) Общая характеристика митоза.
- 8) Фазы митоза.
- 9) Биологическое значение митоза.
- 10) Цитокинез.
- 11) Амитоз (прямое деление).
- 12) Общая характеристика мейоза.
- 13) Первое мейотическое деление (редукционное).
- 14) Второе мейотическое деление.
- 15) Отличительные признаки клеток прокариот и эукариот.
- 16) Сравнительная характеристика строения и признаков растительной и животной клетки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Блинов, В.А. Биологические мембраны : учебно-методическое пособие / В.А. Блинов, В.И. Латышев. – Саратов : ИП «Экспресс тиражирование», 2009.
2. Коницев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
3. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
4. Цитология с основами патологии клетки : учебное пособие / Ю.Г. Васильев, В.М. Чучков, Т.А. Трошина. – М.: Зоомедлит, 2007. – 231 с. – ISBN 978-5-91223-002-8

### *Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
2. Коницев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6
3. Курбатова, Н.С. Учебное пособие по общей биологии [Электронный ресурс] / Н.С. Курбатова, Е.А. Козлова. – Саратов: Научная книга, 2012. – 160 с. – ISSN 2227-8397 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>
5. Портал о генетике – <http://eguerrieri.info>

## Лекция 3

# ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА

### 3.1. Типы питания микроорганизмов

Различают углеродное и азотное питание микроорганизмов. По типу углеродного питания микробы принято делить на *аутотрофы* и *гетеротрофы*.

*Аутотрофы* или прототрофы (греч. *autos* – сам, *trophe* – пища), микроорганизмы, способные воспринимать углерод из угольной кислоты ( $\text{CO}_2$ ) воздуха. К ним относят нитрифицирующие бактерии, железобактерии, серобактерии и др. Они превращают  $\text{CO}_2$  в сложные органические соединения путем хемосинтеза, т.е. путем окисления химических соединений ( $\text{NH}_3$ , нитритов,  $\text{H}_2\text{S}$  и др.). Т.е. они способны из неорганических соединений создавать органические соединения. Поскольку такие микробы не нуждаются в углероде, входящем в органические соединения животных и человека, они не являются болезнетворными. Однако имеются и такие бактерии, которые усваивают углерод из  $\text{CO}_2$  воздуха и из органических соединений – это так называемые *миксотрофы* (миксо – смесь, т.е. смешанный тип питания). Некоторые аутотрофы осуществляют питание за счет фотосинтеза, подобно зеленым растениям. Так, пурпурные серобактерии вырабатывают пигмент типа хлорофилла – бактериопурпурин, при помощи которого происходит использование световой энергии (фотосинтез) для построения органических веществ из  $\text{CO}_2$  и неорганических солей.

*Гетеротрофы* (*heteros* – другой) – получают углерод главным образом из готовых органических соединений. Гетеротрофы – возбудители различного рода брожений, гнилостные бактерии, а также все болезнетворные микроорганизмы: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, листериоза сальмонеллеза, гноеродные микроорганизмы – стрептококки, стафилококки, диплококки и ряд других патогенных для животного организма возбудителей. Гетеротрофы включают в себя две подгруппы: *метатрофы* и *паратрофы*.

*Метатрофы* или *сапрофиты* живут за счет использования мертвых субстратов (*sapros* - гнилой, *phyton* - растение) – гнилостные микробы. *Паратрофы* (греч. *parasitos* – нахлебник) паразиты, живущие на поверхности или внутри организма хозяина и питающиеся за его счет.

В качестве источника углерода гетеротрофы чаще всего используют углеводы, спирты, различные органические кислоты. Наиболее полноценным источником углерода являются сахара, спирты (глицерин, манит, сорбит и др.), карбоновые кислоты (глюкуроновая) и оксикислоты (молочная, яблочная).

Основным источником азотного питания у аутотрофов являются неорганические соединения азота, т.е. соли азота. У гетеротрофов – аминокислоты.

В качестве универсального источника питания азота и углерода в питательных средах применяют пептоны.

Необходимые для жизни бактерий минеральные соли (S, P и др.) почти всегда имеются в естественной питательной среде.

Бор, цинк, магний, кобальт встречаются в бактериях в ничтожных количествах и служат стимуляторами роста микробов.

### 3.2. Теория лимитирования и ингибирования роста клеток элементами питания

Периодический метод культивирования предусматривает внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции. Концентрация микроорганизмов в периодической культуре нарастает и останавливается либо из-за лимитирования субстратом, либо из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности. Для этого типа культивирования характерно непрерывное изменение физиологического состояния клеток, вызванное изменениями условий, производимыми жизнедеятельностью самих клеток. Отсюда следует, что периодическая система может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени. После фазы экспоненциального (логарифмического) роста популяция начинает испытывать недостаток элементов питания и угнетается продуктами метаболизма, что ведет к нарушению физиологического состояния клеток. Периодические культуры находятся в неустойчивом состоянии, что является серьезным недостатком, особенно когда их применяют при изучении свойств микроорганизмов. Практически все системы периодического культивирования являются закрытыми, поскольку микроорганизмы в них размножаются и проходят все фазы развития без притока питательной среды и оттока культуральной жидкости.

### 3.3. Закономерности роста популяций микроорганизмов

Микроорганизмы, попав в свежую полноценную питательную среду, начинают размножаться не сразу. Этот период называют лаг-фазой - **I фаза** (рис. 3.1). В этот период культура как бы привыкает к новым условиям обитания. Активируются ферментные системы, если необходимо, синтезируются новые ферментные системы, клетка готовится к синтезу нуклеиновых кислот и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизмов, состава питательной среды и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевного материала, тем короче эта фаза.

**II фаза** называется фазой ускоренного роста, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

Затем следует логарифмическая, или экспоненциальная фаза роста - **III фаза**. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени.

Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Это является основной причиной снижения скорости роста культуры. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в питательной среде образуется так много клеток, что для новых поколений клеток не хватает пространства, а точнее, поверхности. Скорость роста снижается, уменьшается число делений клеток, наступает **IV фаза** – фаза замедления или уменьшения скорости роста.

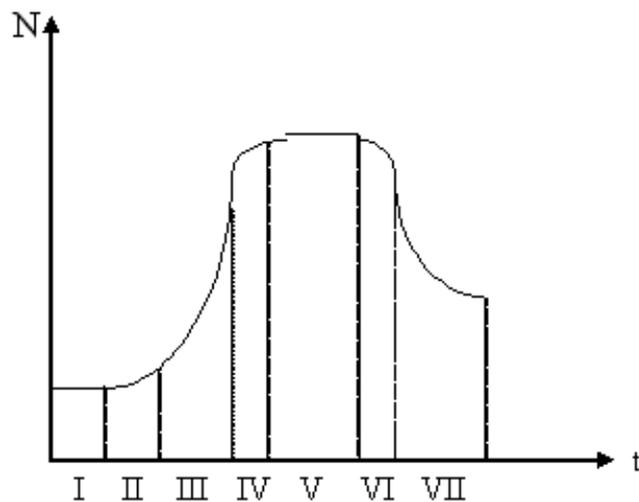


Рис. 3.1. Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования): I, II, III, IV, V, VI, VII – фазы роста

**V фаза** называется стационарной (фазой линейного роста). Масса и количество всех живых клеток достигает максимума. Количество вновь образовавшихся клеток на этом этапе равно количеству клеток, отмерших и автолизированных (разрушенных клеточными ферментами).

В какой-то момент это равновесие нарушается, и количество отмерших клеток превышает прирост. Наступает **VI фаза** – фаза ускорения отмирания.

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме **VII фазой**, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая называется фазой отмирания. На этой стадии биомасса клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

При выращивании бактерий на жидкой питательной среде наблюдается придонный, диффузный или поверхностный (в виде пленки) рост культуры.

Бактерии, растущие на плотных питательных средах, образуют изолированные колонии округлой формы с ровными или неровными краями (S- и R-формы), различной консистенции и цвета, зависящего от пигмента бактерий. Пигменты, растворимые в воде, диффундируют в питательную среду и окрашивают ее, например синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) окрашивает среду в синий цвет. Другая группа пигментов нерастворима в воде, но растворима в органических растворителях. Так, колонии «чудесной палочки» имеют кроваво-красный пигмент, растворимый в спирте. И, наконец, существуют пигменты, не растворимые ни в воде, ни в органических соединениях.

Вид, форма, цвет и другие особенности колоний на плотной питательной среде могут учитываться при идентификации бактерий, а также отборе колоний для получения чистых культур.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Аутотрофы.
- 2) Гетеротрофы.
- 3) Метатрофы.
- 4) Паратрофы.
- 5) Теория лимитирования и ингибирования роста клеток элементами питания.

- б) Характеристики фаз роста популяции микроорганизмов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
3. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
5. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
6. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
7. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

### *Дополнительная*

1. Безбородов, А.М. Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5
2. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
3. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
4. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
5. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 4

### ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

#### 4.1. Биосфера и распространение микроорганизмов

**Микрофлора почвы.** В почве живут и развиваются самые разнообразные микроорганизмы: амёбы, инфузории, грибы, водоросли, актиномицеты и бактерии. Из структурных частей почвы для микробиологии особый интерес представляет её органическое вещество – гумус, состоящий из остатков животных и растительных организмов и обитающих в почве, микробов. Поверхностный слой почвы беднее микробами, т.к. на них вредно воздействуют факторы внешней среды: высушивание, ультрафиолетовые лучи, солнечный свет, температура повышенная и др. Наибольшее количество микроорганизмов находится на глубине 5-15 см, меньшее на глубине 20-30 см и ещё меньше на глубине 30-40 см. Почвы, богатые микроорганизмами биологически более активны. Между плодородием почвы и содержанием в ней микроорганизмов имеется определенная зависимость. Подсчеты показали, что на каждый га малопродуктивной почвы приходится 2,5-3,0 тонны микробной биомассы; высокопродуктивной – до 16 тонн. Число микроорганизмов в 1 г почвы может колебаться от  $1-3 \cdot 10^6$  до  $20-25 \cdot 10^9$ .

Наиболее богаты микрофлорой возделываемые (культурные) почвы; бедны песчаные, горные и почвы, лишённые растительности. Содержание микроорганизмов в почве увеличивается с севера на юг. Цвет и запах почвы также зависят от состава микроорганизмов. Запах почвы придают определенные виды актиномицетов. Почвенные бактерии *Bacillus subtilis*, *mycoides*, *mesentericus*, *megaterium*; *Clostridium tetani*, *perfringens*, *botulinum*; а также термофильные, пигментные и др., составляющие иногда 80-90% всей микрофлоры почвы.

В ряде случаев почва представляет резервуар для некоторых патогенных микробов, попадающих с выделениями больных животных или трупами. Длительность выживания в почве патогенных бактерий зависит от их биологических свойств и условий среды обитания. Наиболее длительно живут спорообразующие микробы – возбудителя столбняка, ботулизма, споры сибирской язвы. Они могут сохраняться в почве на протяжении десятилетий. При благоприятных условиях микробы в почве могут не только выжить, но и долго (годы) сохранять вирулентные свойства.

Для общей оценки санитарного состояния почвы основное значение имеет наличие *E. coli*, т.к. сроки выживания этой бактерии примерно равны срокам выживания других патогенных представителей.

**Микрофлора воды.** Вода – естественная среда обитания микробов, основная масса которой поступает из почвы, воздуха, с оседающей пылью, с отбросами, стоками, мочой и т.д. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах в илистых отложениях океанов, морей, болот, минеральных водах. Их находят как в поверхностных слоях, так и на глубине до 10 тыс. метров.

Качественный состав обитающих в воде микроорганизмов зависит в основном от самой воды, поступления в неё сточных и промышленных отходов. К постоянно живущим в воде микроорганизмам относятся *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Spirillum* и др. Кроме сапрофитов в воде могут быть возбудители инфекционных болезней животных и человека.

**Микрофлора воздуха.** Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы, воды, откуда они вместе с пылью и капельками влаги увлекаются в атмосферу. Воздух явля-

ется неблагоприятной средой для размножения микроорганизмов. Отсутствие питательных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов в воздухе. Вследствие этого микрофлора воздуха менее обильна, чем микрофлора почвы и воды.

Состав микробов воздуха весьма разнообразен. В воздухе часто встречаются пигментные сапрофитные бактерии (микрококки, сарцины), споровые (сенная и картофельная др. палочки), актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи и др. Наряду с сапрофитами в воздухе встречаются условно-патогенные микроорганизмы, споры грибов из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*.

В животноводческих помещениях аэрозоли возникают при кашле, отфыркивании, быстром перемещении животных, во время раздачи, особенно грубых кормов, а также при чихании, кашле, разговоре обслуживающего персонала. Доказано, что в 1 м<sup>3</sup> воздуха животноводческих помещений содержится до 2 млн, иногда более микробов, в том числе патогенных.

Наибольшее количество микроорганизмов содержит воздух крупных промышленных городов. Воздух же полей, лесов, лугов, а также над водными пространствами в удалении от населенных пунктов отличается сравнительной чистотой. Значительные изменения претерпевает микрофлора воздуха в зависимости от времени года. Максимальное количество микробов обнаружено в июне – августе, а минимальное – в декабре – январе.

#### **Микрофлора организма животных и человека.**

*Микрофлора кожи.* Постоянные обитатели кожи – стафилококки, стрептококки, сарцины, актиномицеты, микрококки, вызывающие нагноительные процессы: фурункулы, гнойники, флегмоны и др.

Из палочковидных форм обнаружены: кишечная палочка, синегнойная палочка, псевдодифтерийная палочка. Также на кожу попадают микробы из аэробов и анаэробов. При плохом уходе животных на 1 см<sup>2</sup> поверхности кожи находится до 1-2 млрд. микробных клеток.

*Микрофлора вымени* – это преимущественно микрококки (*Micrococcus luteus*, *candidus* и др.). Внешняя кожа вымени из-за наличия грубых и мелких складок – это место скопления практически всех микробов. При недостаточно тщательной уборке и дезинфекции помещения обычно обнаруживается более 10<sup>5</sup> микробов на 1 см<sup>2</sup> кожи вымени, вследствие чего вымя может стать одним из главных источников заражения выдоенного молока. Из патогенных микробов часто встречается возбудители маститов (*Streptococcus agalactiae*, *uberis*, *S. aureus*) и колимаститов (*E. coli*, *Klebsiella aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и др.). *Streptococcus agalactiae* вызывает 70-80% всех бактериальных маститов.

*Микрофлора конъюнктивы.* Находится небольшое количество микробов (стафилококки, стрептококки, сарцины, реже микоплазмы, микрококки, актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи).

*Микрофлора дыхательных путей.* У новорожденных в дыхательных путях микроорганизмов нет. При дыхании на слизистые оболочки верхних дыхательных путей из воздуха оседают бактерии в основном это стрептококки, стафилококки, микрококки.

*Микрофлора пищеварительно канала.* У новорожденных желудочно-кишечный тракт не содержит микробы. Через несколько часов организм заселяется микрофлорой, которая в процессе жизнедеятельности может видоизменяться, но в основном остается, стабильной до конца жизни животного. Микрофлора бывает факультативная, которая

может меняться в зависимости от корма, условий содержания и т.д. и облигатная (постоянная), которая представлена молочнокислыми бактериями, *E. coli*).

*Микрофлора полости рта.* Она наиболее обильна и разнообразна. Обнаружено более 100 видов микроорганизмов. К постоянным обитателям относят диплококки, стафилококки, сарцины, микрококки, анаэробы и аэробы, целлюлозоразрушающие бактерии, спирохеты, грибы, дрожжи и др.

*Микрофлора желудка.* Она относительно бедна как по количественному, так и по качественному составу. Объясняется это бактерицидным действием кислого желудочного сока. В желудке выживают споровые бактерии (бациллы), микобактерии, сарцины, молочнокислые бактерии, актиномицеты, энтерококки и др. При понижении кислотности, а также при заболевании желудка в его содержимом находят богатую микрофлору гнилостных бактерий, дрожжей, плесневых грибов и др. микроорганизмов.

*Микрофлора рубца* жвачных животных более богата микробами. Здесь много гнилостных бактерий, возбудителей различных брожений. С кормом сюда попадает большое количество эпифитной и почвенной микрофлоры. Здесь много целлюлозоразрушающих бактерий, которые переваривают клетчатку с помощью целлюлазы до глюкозы, которая легко усваивается организмом животных. Пектиновые вещества расщепляют *B. tacerans* и др. Стрептококки сбраживают крахмал, глюкозу с образованием молочной кислоты. Пропионовокислые бактерии сбраживают лактаты с образованием пропионовой кислоты, частично масляной и уксуснокислой, продуцируют витамины группы В. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины, синтезируют все витамины, за исключением витаминов А, Е, D.

*Микрофлора тонкого кишечника.* Она наиболее бедна. В 12-перстной и тощей кишках ослабляется деятельность целлюлозных бактерий. Здесь чаще обитают устойчивые к желчи энтерококки, ацидофильные, споровые микробы, актиномицеты.

*Микрофлора толстых кишок.* Она наиболее богата. Постоянные обитатели – энтерококки, стафилококки, стрептококки, целлюлозные бактерии, актиномицеты, ацидофилы, термофилы, споровые формы, дрожжи, плесневые грибы, гнилостные бактерии. Обилие микроорганизмов объясняется наличием в них больших объемов переваренной пищи. Установлено, что 1/3 сухого вещества фекальных масс человека состоит из микробов. У здоровых животных наряду с нормальной микрофлорой в ряде случаев обнаруживают патогенные микроорганизмы – возбудителя столбняка, инфекционного аборт кобыл, сибирской язвы, рожи свиней, пастереллеза, сальмонеллеза и др. инфекций.

*Микрофлора мочеполовых органов.* На слизистой оболочке мочеполовых органов обнаружены стафилококки, стрептококки, микрококки, кислотоустойчивые микобактерии и др. При физиологическом состоянии мочеполовых путей микрофлора обнаруживается только в их наружных частях. Матка, яичники, семенники, мочевой пузырь в физиологическом состоянии стерильны.

## 4.2. Действие факторов химической и физической природы на микроорганизмы

### Действие физических факторов

*Температура.* Низкие температуры микробы переносят сравнительно легко. Холерный вибрион не теряет жизнеспособность при температуре  $-32^{\circ}\text{C}$ . Некоторые же из них остаются жизнеспособными при температуре жидкого азота ( $-195^{\circ}\text{C}$ ), жидкого воздуха ( $-253^{\circ}\text{C}$ ). Дифтерийные палочки переносят замораживание в течение 3 месяцев. Сальмонеллы брюшного тифа длительно выживают во льду. Споры бацилл выдерживают температуру  $-250^{\circ}\text{C}$  в течение трех суток. Низкие температуры приостанавливают гни-

лостные и бродильные процессы. На этом принципе построено пользование использованием в практике ледников, погребов и холодильных установок для сохранения пищевых продуктов. При низких температурах происходит замедление процессов обмена веществ.

Губительное действие на микробов оказывает влияние чередующихся высоких и низких температур. Большинство аспорогенных бактерий погибают при температуре 58-60 °С через 30-60 мин. Споры выдерживают кипячение от нескольких минут до 3 часов, но погибают от действия сухого жара при температуре 160-170°С в течение 1-1,5 часов.

В основе бактерицидного действия высоких температур лежат повреждение рибосом, денатурация белков и нарушение осмотического барьера. Высокие температуры довольно быстро разрушают вирусы. Вирусы гепатита А длительно сохраняются в воде.

Микроорганизмы обладают различной устойчивостью к *высушиванию*. Чувствительные гонококки, гемофильные бактерии, фаги. Холерный вибрион не погибает под влиянием высушивания 2 суток, чумная палочка - 8, дифтерийная – 30 суток. Высыхающая мокрота больных туберкулезом остается заразной 10 месяцев. Одним из методов консервирования пищевых продуктов является сублимация - обезвоживание при низкой температуре и высоком вакууме, которое сопровождается испарением воды: быстрым охлаждением и замораживанием. Продолжительность сохранения пищевых продуктов более 2 лет. Сублимационная сушка обеспечивает сохранение всех сахаров, витаминов, ферментов. Высушивание в вакууме при низкой температуре не убивает бактерий и вирусы. Этот метод используется в производстве стабильных и с длительным сроком хранения живых вакцин против туберкулеза, чумы.

Наиболее бактерицидными являются *прямые солнечные лучи*, а также *ультрафиолетовые лучи*, *электромагнитные лучи* с длиной волны 200 – 300 мкм, *рентгеновские лучи* с длиной волны 0,005 – 2 мкм. *Коротковолновые лучи* используются для дезинфекции палат, консервирования продуктов, приготовления вакцин. Очень быстро инактивируются вирусы под влиянием ультрафиолетовых лучей с длиной волны 260 – 300 мкм. Вирусы сравнительно менее устойчивы к рентгеновским лучам.

*Высокое атмосферное давление* бактерии переносят легко, они не изменяются от давления в 100 – 900 атм. на глубине морей и океанов 1000 – 10000 м. Дрожжи сохраняют свою жизнеспособность при давлении 500 атм.

Бактерицидными свойствами обладают *ультразвуковые волны* с частотой около 20000 Гц, которые в настоящее время используются для стерилизации пищевых продуктов.

Губительное действие оказывают на микробы *отрицательно заряженные ионы*. Они могут быть использованы в практике стерилизации пищевых продуктов. Холодный метод стерилизации имеет ряд преимуществ: он не изменяет качества продуктов, которая происходит при тепловой обработке.

*Стерилизация и пастеризация.* Стерилизацию производят кипячением или в автоклаве. Пастеризация широко применяется для обезвреживания молока путем прогревания его при 65 °С в течение 30 мин., 72 – 75 °С в продолжение 15 – 30 с, 85 -90°С моментально с последующим охлаждением. Для предотвращения развития вредных микробов, окисляющих вино, пиво, также применяют пастеризацию, при этом не разрушаются витамины, сохраняются вкусовые качества вин и соков.

**Действие химических веществ.** Бактерицидные химические вещества по их действию на бактерии подразделяются на поверхностно активные вещества, фенолы и их

производные красители, соли тяжелых металлов, окислители и группу формальдегида.

*Поверхностно активные вещества* вызывают резкое снижение поверхностного натяжения, что приводит к нарушению функции клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Это жирные кислоты и мыла.

*Соли тяжелых металлов* задерживают рост бактерий, вызывая коагуляцию белковой клетки.

*Ряд металлов (олово, серебро, золото)* обладают олигодинамическим действием. Серебро при контакте с водой сообщает ей бактерицидные свойства ко многим видам бактерий. Механизм – положительно заряженные ионы серебра адсорбируются отрицательно заряженной поверхностью бактерий и изменяют проницаемость их цитоплазматической мембраны – нарушение питания и размножения. Также инактивируются вирусы.

*Окислители.* Хлор широко используется для обезвреживания воды. Хлорная известь и хлорамин используются для дезинфекции. Йод в виде спиртового раствора окисляет активные группы белков цитоплазмы бактерий.

*Формальдегид.* Применяют в виде 40% раствора. Убивает как вегетативные, так и споровые формы.

#### 4.3. Антимикробное действие антибиотиков

По механизму антимикробного действия антибиотики можно разделить на следующие группы:

##### **Ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):**

- бета-лактамы – пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы;
- гликопептиды – ванкомицин, клиндамицин.

Механизм блокады синтеза бактериальной клеточной стенки ванкомицином отличается от такового у пенициллинов и цефалоспоринов и соответственно не конкурирует с ними за места связывания. Поскольку пептидогликана нет в стенках животных клеток, то эти антибиотики обладают очень низкой токсичностью для макроорганизма, и их можно применять в высоких дозах (мегатерапия).

**Антибиотики, вызывающие повреждение цитоплазматической мембраны** (блокирование фосфолипидных или белковых компонентов, нарушение проницаемости клеточных мембран, изменение мембранного потенциала и т. д.), относятся:

- полиеновые антибиотики – обладают ярко выраженной противогрибковой активностью, изменяя проницаемость клеточной мембраны путем взаимодействия (блокирования) со стероидными компонентами, входящими в ее состав именно у грибов, а не у бактерий;
- полипептидные антибиотики.

**Антибиотики, подавляющие белковый синтез** – самая многочисленная группа антибиотиков. Нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и кончая взаимодействием с рибосомами – блокирование связывания транспортной т-РНК с 30S-субъединицами рибосом (аминогликозиды), с 50S-субъединицами рибосом (макролиды) или с информационной и-РНК (на 30S-субъединице рибосом – тетрациклины). В эту группу входят:

- аминогликозиды (например, аминогликозид гентамицин, угнетая белковый синтез в бактериальной клетке, способен нарушать синтез белковой оболочки вирусов и поэтому может обладать противовирусным действием);

- макролиды;
- тетрациклины;
- хлорамфеникол (левомицетин), нарушающий синтез белка микробной клеткой на стадии переноса аминокислот на рибосомы.

**Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот** обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью и поэтому используются как противоопухолевые средства. Один из антибиотиков, относящихся к этой группе, - рифампицин – ингибирует ДНК-зависимую-РНК-полимеразу и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Микрофлора почвы.
- 2) Микрофлора воды.
- 3) Микрофлора воздуха.
- 4) Микрофлора организма животных и человека.
- 5) Действие факторов химической природы на микроорганизмы.
- 6) Действие факторов физической природы на микроорганизмы.
- 7) Механизм действия антибиотиков на микроорганизмы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
3. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
5. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
6. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
7. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

#### *Дополнительная*

1. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 5

### КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

#### 5.1. Кинетическое описание процесса роста микроорганизмов. Экспоненциальная модель роста

Кинетические характеристики процесса отражают скорость протекания биохимических превращений во времени.

**Кинетические показатели роста биомассы.** Скорость роста биомассы – важный показатель процесса ферментации. Вид кривой роста очень похож для различных микроорганизмов, однако время ферментации существенно различается. Для быстрорастущих бактерий весь цикл может закончиться за несколько часов, а для мицелиальных микроорганизмов или изолированных клеток растений время составляет недели и месяцы.

Для описания скорости роста используется *общая скорость роста*  $Q_X$ :

$$Q_X = \frac{dX}{dt}$$

Этот показатель не вполне отражает физиологическое состояние биомассы в процессе его роста. На рис. 5.1 представлены два процесса, протекающие с одинаковой общей скоростью роста биомассы.

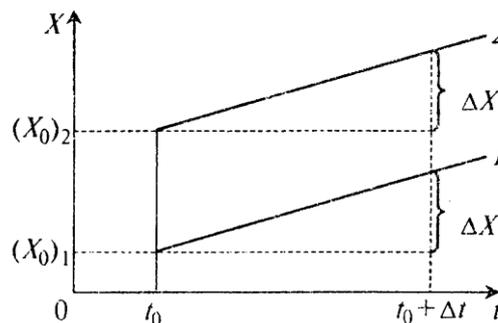


Рис. 5.1. Сравнение двух процессов ферментации (1 и 2) с одинаковой общей скоростью роста биомассы

В первом процессе исходная концентрация биомассы меньше, во втором – больше. Поэтому хотя абсолютный прирост биомассы  $\Delta X$  за одинаковое время  $\Delta t$  такой же, относительный прирост  $\Delta X/X_0$  различается существенно: в первом случае количество биомассы возрастает в несколько раз по отношению к начальному, а во втором – по отношению к начальной биомассе рост составляет всего 20 - 30 %. Ясно, что биомасса «работает» в этих двух процессах по-разному, хотя и «выдает» одинаковое количество продукции за то же время.

Большой интерес для характеристики интенсивности роста представляет *удельная скорость роста* в пересчете на единицу биомассы (так как рост биомассы пропорционален концентрации клеток)  $\mu$ :

$$\mu = \frac{Q_X}{X} = \frac{dX}{X dt}$$

Величина  $\mu$  в ходе обычного периодического процесса изменяется (рис. 5.2).

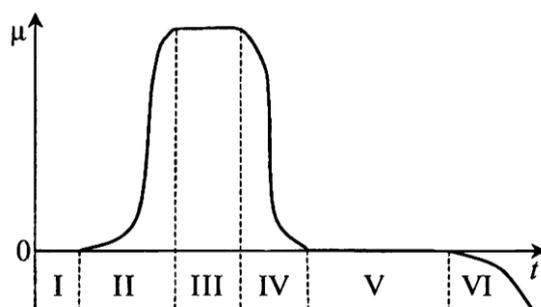


Рис. 5.2. Изменение удельной скорости роста биомассы во времени в периодическом процессе ферментации: I – лаг-фаза; II – фаза ускорения роста; III – фаза экспоненциального роста; IV – фаза замедления роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания.

В экспоненциальной фазе, когда рост ничем не лимитирован, величина  $\mu$  постоянна, а рост биомассы описывается уравнением:

$$\frac{dX}{dt} = \mu x.$$

Если бы процесс с самого начала определялся этой зависимостью, то концентрация биомассы изменялась бы начиная с  $X_0$  по уравнению:

$$X = X_0 e^{\mu t}.$$

Прологарифмировав обе части уравнения, получаем:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t.$$

Это уравнение показывает, почему для экспоненциальной фазы в логарифмических координатах график будет прямолинейным, причем тангенс угла наклона пропорционален  $\mu$  (рис. 5.3).

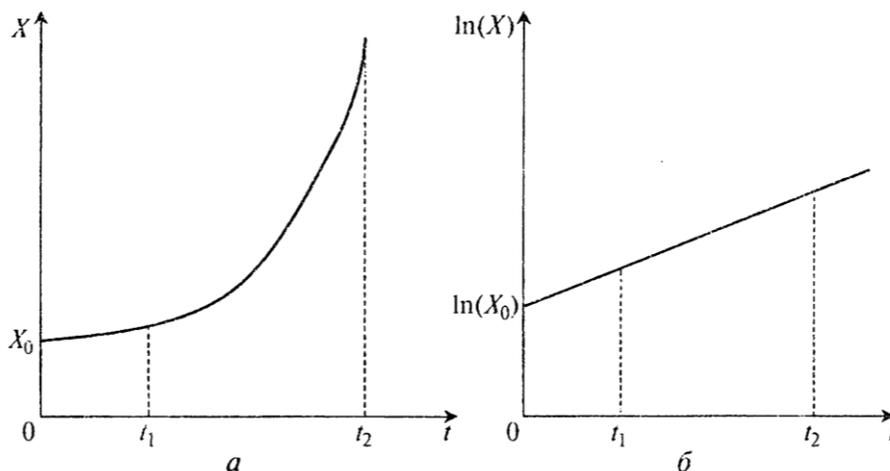


Рис. 5.3. Экспоненциальный рост биомассы во времени, представленный в обычной (а) и полулогарифмической (б) системе координат; тангенс угла наклона прямой равен  $\mu$

Таким образом, по двум точкам на линейном участке полулогарифмического графика можно определить  $\mu$  по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}.$$

Микробиологи предпочитают другой параметр – *время генерации g* – время, за которое биомасса культуры удваивается. Легко найти связь между величиной  $\mu$  и  $g$ . Как видно из уравнения

$$\text{при } t = 0 \quad X = X_0;$$

$$\text{при } t = g \quad X = 2X_0.$$

Тогда

$$2X_0 = X_0 e^{\mu g}.$$

$$e^{\mu g} = 2;$$

$$\mu g = \ln 2;$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,69}{\mu}.$$

Удельную скорость роста  $\mu$  иногда называют «коэффициент скорости роста». Это не совсем правильно. Слово «коэффициент» неявно подразумевает, что это некая постоянная величина, которая не изменяется со временем. На самом деле величина  $\mu$  в ходе периодического процесса изменяется, и можно построить кривую этого изменения (рис. 5.3). Это не коэффициент, а параметр – такой же, как  $X$ ,  $S$ ,  $P$ .

Из рис. 5.3 следует, что в фазе отмирания удельная скорость роста приобретает отрицательное значение.

Размерность величины  $\mu$  – [ $\text{ч}^{-1}$ ] или [ $\text{мин}^{-1}$ ], но лучше первое, так как микробиологические процессы протекают не так быстро.

Удельная скорость роста для различных видов микроорганизмов имеет разные значения. Для многих бактерий она велика и может достигать 0,5 и даже 1,0  $\text{ч}^{-1}$ . Для грибов и актиномицетов скорость роста не выходит за пределы 0,1  $\text{ч}^{-1}$ , а для микроводорослей, а также растительных и животных клеток находится на уровне 0,01  $\text{ч}^{-1}$ .

## 5.2. Кинетическое описание биосинтеза продуктов микроорганизмами

**1. Кинетика потребления субстрата.** Поскольку субстрат потребляется, его концентрация  $S$  с течением времени падает, и, в конце концов, недостаток субстрата начинает тормозить дальнейший рост клеток микроорганизмов (рис. 5.4).

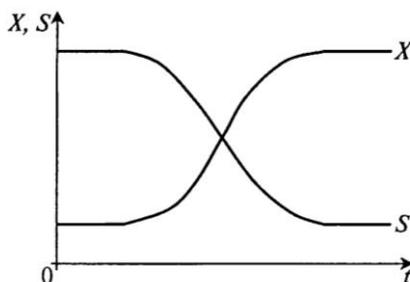


Рис. 5.4. Типичная взаимозависимость изменения во времени концентраций биомассы и субстрата

**Общая скорость потребления субстрата  $Q_S$ :**

$$Q_S = - \frac{dS}{dt}.$$

Знак (–) обозначает, что скорость потребления положительна, когда концентрация субстрата в среде падает (т.е. скорость изменения концентрации отрицательна).

**Удельная скорость потребления субстрата  $q_S$ :**

$$q_S = \frac{Q_S}{X} = - \frac{1}{x} \frac{dS}{dt}.$$

**2. Кинетика биосинтеза продуктов метаболизма.** В некоторых процессах наряду с ростом биомассы происходит накопление в среде продукта метаболизма (его текущая концентрация  $P$ ).

**Общая скорость биосинтеза продукта метаболизма  $Q_P$**  в периодическом процессе:

$$Q_P = \frac{dP}{dt}.$$

**Удельная скорость биосинтеза продукта** из единицы биомассы  **$q_P$ :**

$$q_P = \frac{Q_P}{X} = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt}.$$

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Кинетические показатели роста биомассы.
- 2) Кинетика потребления субстрата.
- 3) Кинетика биосинтеза продуктов метаболизма.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
3. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
5. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
6. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
7. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]:

учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

*Дополнительная*

1. Безбородов, А.М. Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5
2. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
3. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
4. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
5. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 6

### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ. СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

#### 6.1. Понятие о генотипе и фенотипе

**Генотип** – это совокупность генов, определяющих способность микроорганизмов к фенотипическому проявлению любого их признака.

Различают истинный генотип и плазмотип.

*Истинный генотип* – совокупность генов, сосредоточенных в бактериальной хромосоме и отвечающих за проявление жизненно важных признаков и свойств.

*Плазмотип* – совокупность внехромосомных генов, локализованных в плазмидах и транспозонах и отвечающих за нежизненно важные признаки и свойства, но придающие определенные преимущества перед другими особями популяции (устойчивость к антибиотикам).

**Фенотип** – это совокупность всех внешних и внутренних признаков микроорганизмов, которые проявляются в данных условиях и данный момент.

#### 6.2. Наследственность, изменчивость и отбор микроорганизмов

Наследственность и изменчивость – две стороны одного явления. В природе постоянно наблюдается процесс передачи наследственных свойств организма из поколения в поколение и в то же время идет процесс изменчивости. По сравнению с другими организмами изменчивость микробов наблюдается чаще и осуществляется легче и быстрее, это объясняется большой быстротой их размножения и пластичностью.

Изменяться могут самые разнообразные свойства микробов – морфологические, ферментативные, антигенные, патогенные и др.

Различают ненаследственную и наследственную изменчивость.

*Ненаследственная изменчивость* (модификация) очень часто наблюдается под воздействием различных факторов внешней среды. Она заключается в количественном изменении некоторых свойств микроба, т. е. в ослаблении и утрате или усилении этих свойств. Когда воздействие факторов, вызвавших эти изменения, прекращается, то возникшие измененные признаки также утрачиваются.

*Наследственная изменчивость* необратима, она развивается вследствие перестройки наследственного аппарата микроорганизма в результате непосредственного внешнего или внутреннего воздействия на него или внедрения чужеродного генетического материала (трансформация, конъюгация, рекомбинация и др.).

В микробиологии основоположником учения об изменчивости является Луи Пастер. Он искусственным путем получил необратимое ослабление вирулентности возбудителей сибирской язвы (1881) и бешенства (1885), а также получил способ приготовления живых вакцин для борьбы с этими заболеваниями. Путем такой направленной изменчивости микробов в настоящее время получено 20 живых вакцин, из них 14 против вирусных и 6 против бактериальных инфекций. Все время идут работы по созданию новых вакцин и улучшению некоторых из существующих.

Благодаря простоте своего строения вирусы обладают большой способностью к изменчивости. Вирусы растений способны приспособляться к условиям жизни в организмах филогенетически очень отдаленных видов. Так, к вирусу табачной мозаики вос-

приимчивы 236 видов растений 33 различных семейств. Из животных вирусов наибольшей изменчивостью обладает вирус гриппа. Вирусы гриппа, выделенные во время отдельных эпидемий в различных странах, отличаются от основных типов А и В по антигенному строению, морфологическим признакам, способности к адаптации и пр.

Изменчивость грибов имеет большое практическое значение, так как многие из них широко используются в различных производствах. Были получены расы дрожжей, хорошо развивающиеся при пониженных или повышенных температурах, требуемых в тех или иных производствах. Для интенсификации бродильных процессов получены расы дрожжей, способные использовать углеводы в больших концентрациях, а также приспособляться к высокому осмотическому давлению, к продуктам собственной жизнедеятельности, к различным физическим и химическим факторам. Применение этих рас дает большую продукцию. Ярким примером этого является производство антибиотиков.

**Отбор положительных мутантов.** Для этого проверяют тысячи мутантных культур. Например, хересные винные дрожжи (*Saccharomyces oviformis*) при переокислении спирта образуют продукты, которые придают вину хересный букет. Но такие дрожжи чувствительны к концентрациям спирта выше 15%. Так, при длительном повышении содержания спирта до 18% и пользуясь методом естественного отбора, удалось выделить штамм, который образует херес при повышенных концентрациях спирта.

Частоту получения положительных мутантов можно увеличить путем использования химических или биохимических факторов:

- селективная детоксикация питательного субстрата;
- добавление в питательную среду ингибитора целевого продукта;
- увеличение проницаемости клеточной мембраны;
- усиление выведения продукта из клетки;
- применение катаболитной репрессии и т.д.

Так, при селективной детоксикации питательного субстрата токсические вещества взаимодействуют с продуктом сверхсинтеза. В результате детоксицируется субстрат и сохраняется выживаемость мутанта. Так получают бета-лактамы антибиотики, которые комплексируются с ионами тяжелых металлов или с токсическими аналогами аминокислот.

### 6.3. Методы селекции микроорганизмов

**Селекция** (от латинского *selectio* – выбор, отбор) – выведение новых и улучшение существующих сортов растений и пород животных и получение полезных видов микроорганизмов, которые при определенных условиях дают наибольшее количество полезной для человека продукции. Селекция основана на изменчивости и наследственности. Теоретической основой селекции является генетика. В результате получают мутанты, наследственность которых изменена.

#### **Методы селекции:**

1. **Метод спонтанных мутаций.** Так были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских дрожжей, уксуснокислых, пропионовокислых бактерий и др. Однако частота спонтанных мутаций невелика. Чтобы возникла мутация ген должен удвоиться  $10^6 - 10^8$  раз.

2. **Индукцированный мутагенез.** Для его проведения используются следующие подходы:

- в протоке лимитируется количество какого-либо субстрата;
- применяют физические мутагены, которые способны повреждать ДНК (ультрафиолетовое, рентгеновское или  $\gamma$ -излучение);
  - используют химические мутагены:
    - ингибиторы предшественников нуклеиновых кислот (азогуанин, азосерин, кофеин);
    - аналоги азотистых оснований нуклеиновых кислот (5-бромурацил, 5-хлорурацил, 2-аминопурин);
    - алкилирующие соединения (диметилсульфат, окись пропилена, фенол, формальдегид);
  - используют биологические факторы (фаги).

После получения мутаций отбирают наиболее продуктивные клоны, которые вновь подвергают воздействию каких-либо мутагенов, т.е. проводят ступенчатый отбор по интересующему признаку. Однако этот метод трудоемок и не позволяет достоверно судить о характере возникших изменений.

**3. Метод отбора продуцентов по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта.** Так, мутантные клеточные клоны моркови устойчивые к этионину (аналог метионина) синтезировали в 20 раз больше метионина, а резистентные к 5-метилтрипрофану – в 30 раз больше триптофана.

Для селекции микроорганизмов используют музейные культуры, известные промышленные продуценты или выделяют микробы из природных субстратов.

*При селекции микроорганизмов следует учитывать ряд их особенностей:*

- каждая клетка при выращивании образует клон, т.е. совокупность генетически однородных особей. Однако вследствие естественных мутаций в клоне развивается гетерогенность и он превращается в популяцию (совокупность клеток с разными генотипами);
  - у микроорганизмов нет скрытой изменчивости;
  - для микроорганизмов не характерно половое размножение, поэтому селекцию клеток можно проводить только вегетативным путем;
  - отбор положительных мутантов проводится быстрее и эффективнее благодаря быстрой смене поколений микроорганизмов.

*Главные этапы селекции микроорганизмов:* выбор объекта селекции, получение ценного продуцента (мутагенез; рекомбиногенез (скрещивание, слияние клеток, генная инженерия и др.); отбор (естественный, искусственный); стабилизация свойств штаммов, полученных в результате селекции; консервация.

### **Вопросы для самоконтроля**

- 1) Понятия «генотип», «истинный генотип», «плазмотип», «фенотип».
- 2) Ненаследственная изменчивость.
- 3) Наследственная изменчивость.
- 4) Отбор положительных мутантов.
- 5) Приемы повышения частоты получения положительных мутантов.
- 6) Селекция, методы селекции.

- 7) Особенности, которые необходимо учитывать при селекции микроорганизмов.
- 8) Главные этапы селекции микроорганизмов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М. : КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
3. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
4. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Жученко, А.А. Генетика : учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский ; ред. А. А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М. : КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2
6. Коницев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
7. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
8. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
9. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
10. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
11. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
12. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов С.Н. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

### *Дополнительная*

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

4. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. Коничев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6
6. Курбатова, Н.С. Учебное пособие по общей биологии [Электронный ресурс] / Н.С. Курбатова, Е.А. Козлова. – Саратов: Научная книга, 2012. – 160 с. – ISSN 2227-8397 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. Медицинская биология и общая генетика [Электронный ресурс]: учебник / Р.Г. Заяц [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 496 с. – ISBN 978-985-06-2182-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
8. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
9. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков : учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М. : КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4
10. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
11. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
12. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>
13. Портал о генетике – <http://eguerrieri.info>

## Лекция 7

### ПРИНЦИПЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

#### 7.1. Пути и механизмы преобразования энергии в живых системах. Биологическое окисление

Окисление органических соединений может быть связано: 1) с отрывом водорода от окисляемого субстрата; 2) с потерей электрона; 3) с замещением атомов на другие, более электроотрицательные атомы. Все три типа реакций имеют место в живой клетке. Субстраты, образующиеся в ходе катаболизма белков, углеводов и липидов, подвергаются дегидрированию с участием дегидрогеназ.

Если акцептором водорода в реакциях дегидрирования служит не кислород, а какой-либо другой субстрат, то совокупность таких реакций называют **анаэробным окислением**. Анаэробное окисление – это процесс генерации водорода с участием никотинзависимых и флавинзависимых дегидрогеназ.

Если же акцептором водорода является кислород и в продуктах реакции присутствует вода, то такие реакции называют **аэробным окислением**, или **тканевым дыханием**. Таким образом, тканевое дыхание – это распад органических веществ в живых тканях, сопровождающийся потреблением кислорода.

В процессе извлечения энергии из питательных веществ можно условно выделить три основные стадии, каждая из которых, как правило, представляет собой совокупность многочисленных биохимических реакций. В результате освобождение энергии в живой клетке происходит постепенно, через многочисленные промежуточные стадии, благодаря чему энергия может аккумулироваться в удобной для клетки химической форме, а точнее, в "высокоэнергетических" связях АТФ. Следует особо отметить тот факт, что в обычной клетке молекула АТФ расходуется в течение 1 мин после ее образования.

У большинства живых организмов – аэробов, живущих в кислородной среде, в ходе энергетического обмена осуществляется три этапа: подготовительный, бескислородный и кислородный, в процессе которых органические вещества распадаются до неорганических соединений. У анаэробов, обитающих в среде, лишенной кислорода, или у аэробов при его недостатке диссимиляция протекает лишь в два первых этапа с образованием промежуточных органических соединений.

**Первый этап – подготовительный** – заключается в ферментативном расщеплении сложных органических соединений на более простые (белков – на аминокислоты, жиров – на глицерин и жирные кислоты, полисахаридов – на моносахариды, нуклеиновых кислот – на нуклеотиды). Распад органических субстратов пищи осуществляется на разных уровнях желудочно-кишечного тракта многоклеточных организмов. Внутриклеточное расщепление органических веществ происходит под действием гидролитических ферментов лизосом. Высвобождающаяся при этом энергия рассеивается в виде теплоты, а образующиеся малые органические молекулы могут подвергнуться дальнейшему расщеплению или использоваться клеткой как «строительный материал» для синтеза собственных органических соединений.

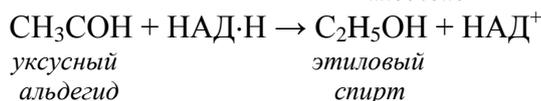
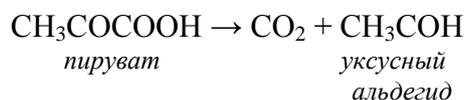
**Второй этап – неполное окисление (бескислородный)** – осуществляется непосредственно в цитоплазме клетки, в присутствии кислорода не нуждается и заключается в дальнейшем расщеплении органических субстратов. Главным источником энергии в клетке является глюкоза. Бескислородное, неполное расщепление глюкозы называют

гликолизом.

**Гликолиз** – многоступенчатый ферментативный процесс превращения шестиуглеродной глюкозы в две трехуглеродные молекулы пировиноградной кислоты (пирувата, ПВК)  $C_3H_4O_3$ . В ходе реакций гликолиза выделяется большое количество энергии – 200 кДж/моль. Часть этой энергии (60%) рассеивается в виде теплоты, остальное (40%) используется на синтез АТФ. В результате гликолиза одной молекулы глюкозы образуется по две молекулы ПВК, АТФ и воды, а также атомы водорода, которые запасаются клеткой в форме НАД·Н, т.е. в составе специфического переносчика – никотинамидадениндинуклеотида. Суммарная формула гликолиза имеет следующий вид:



Дальнейшая судьба продуктов гликолиза – пирувата и водорода в форме НАД·Н – может складываться по-разному. У дрожжей или в клетках растений при недостатке кислорода происходит **спиртовое брожение** – ПВК восстанавливается до этилового спирта:



В клетках животных, испытывающих временный недостаток кислорода, например, в мышечных клетках человека при чрезмерной физической нагрузке, а также у некоторых бактерий происходит молочнокислое брожение, при котором пируват восстанавливается до молочной кислоты:



С накоплением лактата связано мышечное утомление. Этот лактат диффундирует из мышечной ткани в кровь и в период восстановления медленно превращается в печени обратно в глюкозу. У мелких животных кислород доставляется циркуляторными системами достаточно быстро, тогда как крупные животные должны прибегать к гликолизу во время усиленной мышечной активности и затем им требуется долгий период восстановления для нейтрализации лактата и восполнения запасов АТФ и гликогена.

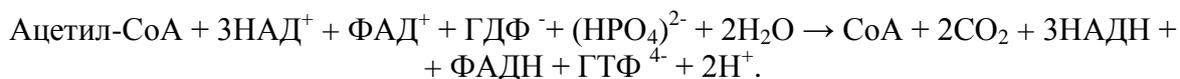
При наличии в среде кислорода продукты гликолиза претерпевают дальнейшее расщепление до конечных продуктов.

**Третий этап – полное окисление (дыхание)** – протекает при обязательном участии кислорода. Аэробное дыхание представляет собой цепь реакций, контролируемых ферментами внутренней мембраны и матрикса митохондрии. Процесс клеточного дыхания состоит из трех стадий. Первая стадия служит для вовлечения органических молекул в процесс дыхания. В случае вовлечения пирувата на этой стадии он окисляется до ацетил-СоА и  $CO_2$  в реакции:



Вторая стадия дыхания – это циклическая последовательность из 9 реакций, осуществляемых 8 ферментами. Этот цикл называется **цикл лимонной кислоты** (по названию первого из образующихся в нем соединений) и известен также как цикл трикарбо-

новых кислот, или цикл Кребса (по имени открывшего его в 1937 г. Ганса Кребса (H. Krebs), Нобелевская премия 1953 г.). Все реакции этого цикла протекают в матриксе митохондрий. Суммарная реакция цикла:



Таким образом, цикл Кребса – это цепь последовательных реакций, в ходе которых из одной молекулы ацетил-КоА образуются две молекулы  $\text{CO}_2$ , молекула АТФ и четыре пары атомов водорода, передаваемые на молекулы-переносчики – НАД и ФАД (флавинадениндинуклеотид).

Суммарную реакцию гликолиза и цикла Кребса можно представить в следующем виде:

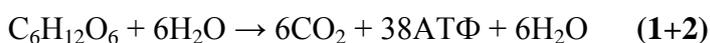
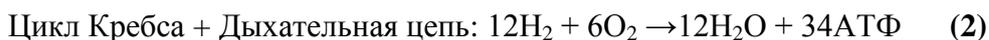
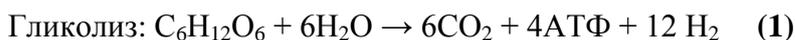


Итак, в результате бескислородного этапа диссимиляции и цикла Кребса молекула глюкозы расщепляется до неорганического диоксида углерода ( $\text{CO}_2$ ), а высвободившаяся при этом энергия частично расходуется на синтез АТФ, но в основном сберегается в нагруженных электронами переносчиках  $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$  и  $\text{ФАД}\cdot\text{H}_2$ . Белки-переносчики транспортируют атомы водорода к внутренней мембране митохондрий, где передают их по цепи встроенных в мембрану белков. Транспорт частиц по цепи переноса осуществляется таким образом, что протоны остаются на внешней стороне мембраны и накапливаются в межмембранном пространстве, превращая его в  $\text{H}^+$ -резервуар, а электроны передаются на внутреннюю поверхность внутренней митохондриальной мембраны, где соединяются в конечном итоге с кислородом:  $\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{O}^{2-}$ .

В результате деятельности ферментов цепи переноса электронов внутренняя мембрана митохондрий изнутри заряжается отрицательно (за счет  $\text{O}^{2-}$ ), а снаружи – положительно (за счет  $\text{H}^+$ ), так что между ее поверхностями создается разность потенциалов. Известно, что во внутреннюю мембрану митохондрий встроены молекулы фермента АТФ-синтетазы, обладающие ионным каналом. Когда разность потенциалов на мембране достигает критического уровня (200 мВ), положительно заряженные частицы  $\text{H}^+$  силой электрического поля начинают проталкиваться через канал АТФазы и, оказавшись на внутренней поверхности мембраны, взаимодействуют с кислородом, образуя воду:  $1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ .

При этом энергия транспортирующихся ионов водорода используется для фосфорилирования АДФ в АТФ:  $\text{АДФ} + \text{Ф} \rightarrow \text{АТФ}$ .

*Суммарные реакции клеточного дыхания:*



## Энергетический обмен у микроорганизмов

### *Типы метаболизма:*

Хемолитотрофы. Источник энергии – окислительно-восстановительные реакции (хемо-); источник электронов – неорганические вещества (лито-).

Хемоорганотрофы. Источник энергии – окислительно-восстановительные реакции (хемо-); источник электронов – органические вещества (орган-).

Фотолитотрофы. Источник энергии – солнечный свет (фото-).

Фотоорганотрофы. Источник энергии – солнечный свет (фото-); источник электронов – органические вещества (орган-).

### *Способы получения энергии:*

*Брожение* – то примитивный энергетический процесс расщепления глюкозы до пирувиноградной кислоты.

Признаки брожения:

- низкий энергетический выход (2 АТФ на 1 молекулу глюкозы);
- субстратный тип фосфорилирования – реакции протекают в цитоплазме;
- реакции протекают внутримолекулярно;
- акцептором являются органические вещества.

В зависимости от конечного продукта выделяют: молочнокислое брожение (лактобактерии, бифидумбактерии, стрептококки), маслянокислое брожение (спорообразующие бактерии), пропионовокислое брожение, спиртовое брожение.

*Дыхание* – процессы окисления глюкозы до углекислого газа и воды. Дыхание – совершенный энергетический процесс. Признаки дыхания:

- высокий энергетический выход (38 АТФ на 1 молекулу глюкозы);
- мембранный тип фосфорилирования – реакции протекают в мезосомах;
- реакции протекают межмолекулярно;
- акцептор – кислород или неорганические вещества.

Процесс дыхания включает три этапа:

1. Гликолиз – в цитоплазме клетки образуется ПВК и высвобождается 2 молекулы АТФ.
2. Цикл трикарбоновых кислот (Кребса) – в мезосомах ПВК окисляется до углекислого газа и воды, высвобождается 36 молекул АТФ.
3. Дыхательная цепь – на цитоплазматической мембране – электроны переносятся на акцептор.

## 7.2. Окислительное фосфорилирование

Известно, что 55% энергии запасается в химических связях АТФ, а 45% - рассеивается в виде теплоты. Синтез АТФ в процессе клеточного дыхания тесно сопряжен с транспортом ионов по цепи переноса и называется **окислительным фосфорилированием**.

Транспорт электронов по ЦПЭ к кислороду сопровождается снижением свободной энергии. Снижение свободной энергии происходит на каждом этапе ЦПЭ, и энергия электронов выделяется порциями.

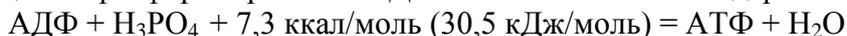
Вместе с тем в дыхательной цепи можно выделить 3 участка, в которых перенос электронов сопровождается относительно большим снижением свободной энергии. Эти этапы способны обеспечить энергией синтез АТФ, так как количество выделяющейся

свободной энергии приблизительно равно энергии, необходимой для синтеза АТФ из АДФ и фосфата. Экспериментально было подтверждено, что процесс переноса электронов по ЦПЭ и синтез АТФ энергетически сопряжены.

Первый процесс – перенос электронов от восстановленных коферментов НАДН и ФАДН<sub>2</sub> через ЦПЭ на кислород – экзергонический. Например:



Второй процесс – фосфорилирование АДФ или синтез АТФ – эндергонический:



Окисление молекулы НАДН в ЦПЭ сопровождается образованием 3 молекул АТФ; электроны от ФАД-зависимых дегидрогеназ поступают в ЦПЭ на КоQ, минуя первый пункт сопряжения. Поэтому образуются только 2 молекулы АТФ. Отношение количества фосфорной кислоты (P), использованной на фосфорилирование АДФ, к атому кислорода (O), поглощённого в процессе дыхания, называют *коэффициентом окислительного фосфорилирования* и обозначают P/O. Следовательно, для НАДН P/O = 3, для сукцината (или флавопротеида) P/O = 2. Эти величины отражают теоретический максимум синтеза АТФ, фактически эта величина меньше.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Анаэробное окисление.
- 2) Аэробное окисление, или тканевое дыхание.
- 3) Стадии извлечения энергии из питательных веществ.
- 4) Гликолиз.
- 5) Спиртовое брожение
- 6) Дыхание.
- 7) Энергетический обмен у микроорганизмов. Типы метаболизма.
- 8) Способы получения энергии микроорганизмами (брожение, дыхание).
- 9) Окислительное фосфорилирование.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная литература

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
3. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
5. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0

7. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
8. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
9. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
10. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
11. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
12. Филлипович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
13. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

*Дополнительная*

1. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

## Лекция 8

### БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ

#### 8.1. Синтез липидов

*Биосинтез жирных кислот* происходит в цитоплазме клетки из ацетил-КоА. Для этого активированная уксусная кислота должна из митохондрий, где она образуется, поступить в цитозоль. Это происходит с помощью челночного механизма, показанного на рисунке 8.1.

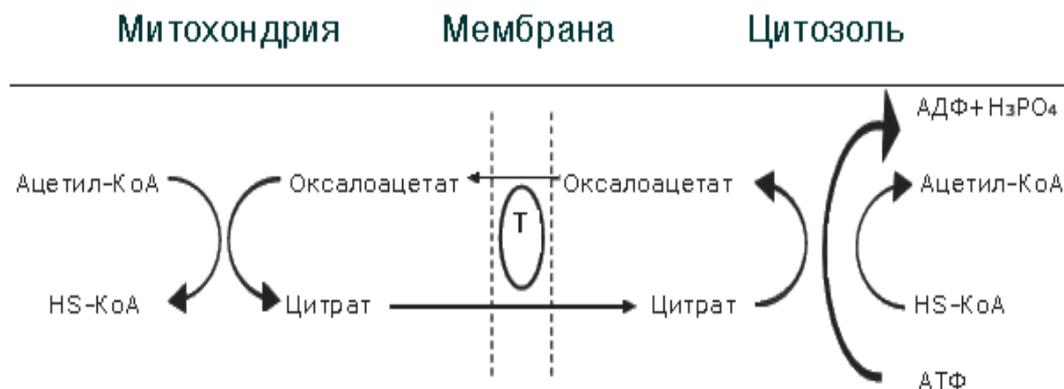
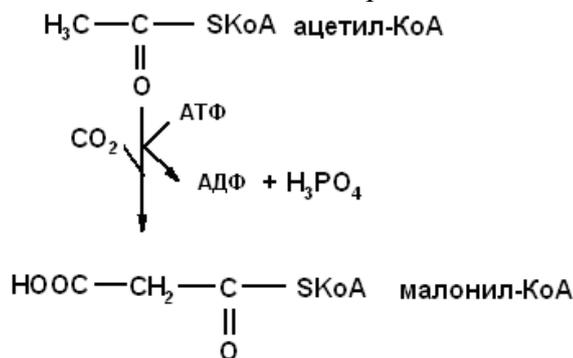


Рис. 8.1. Перенос ацетильного остатка из митохондрий в цитозоль (Т-транслоказа)

Путь биосинтеза жирных кислот не является обращенным процессом  $\beta$ -окисления. Ключевым соединением в синтезе жирных кислот оказывается малонил-КоА, который образуется из ацетил-КоА и  $\text{CO}_2$  под влиянием ацетил-КоА-карбоксилазы:



Затем в процессы синтеза включается многофункциональный фермент пальмитилсинтаза. В результате ряда последовательных реакций, которые протекают на шести центрах (доменах) фермента образуется жирная кислота, в основном пальмитиновая, которая гидролитически отщепляется от пальмитилсинтазы с помощью другого фермента – пальмитилдеацилазы.

Удлинение пальмитиновой кислоты, т.е. образование 18, 20, 22 и 24-х углеродсодержащих жирных кислот происходит в митохондриях. Схематически биосинтез насыщенной жирной кислоты представлен на рисунке 8.2.

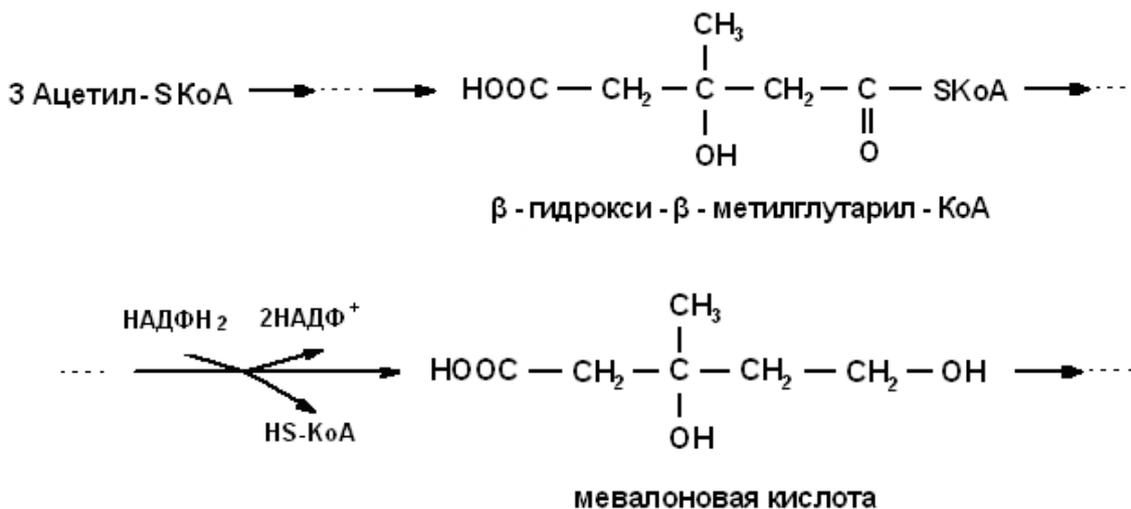


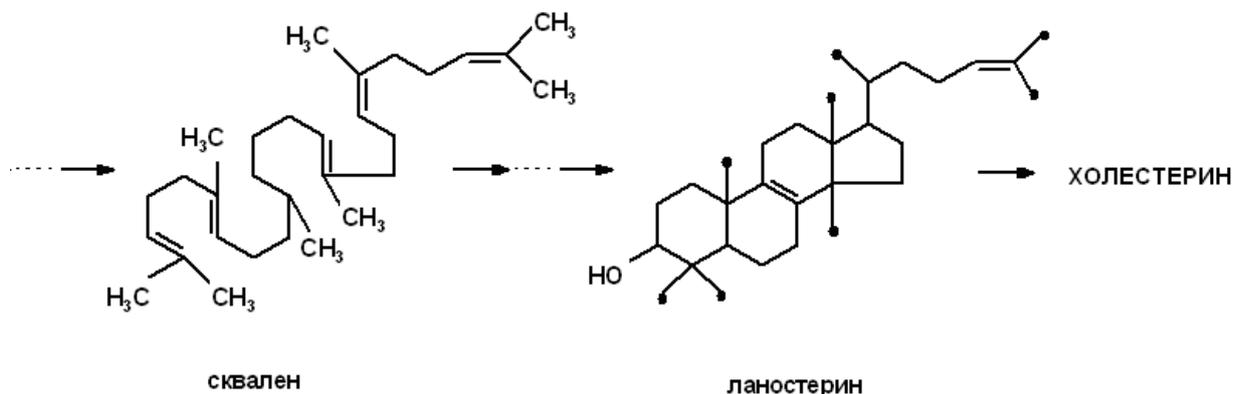


Рисунок 8.3. Пути биосинтеза некоторых жирных кислот

**Биосинтез холестерина.** Основное количество холестерина синтезируется в печени из уксусной кислоты приблизительно в 35 ферментативных стадий, в которых различают 3 основных этапа:

- 1) активный ацетат (ацетил-КоА) превращается в мевалоновую кислоту;
- 2) из мевалоновой кислоты образуется сквален;
- 3) сквален циклизуется в холестерин.



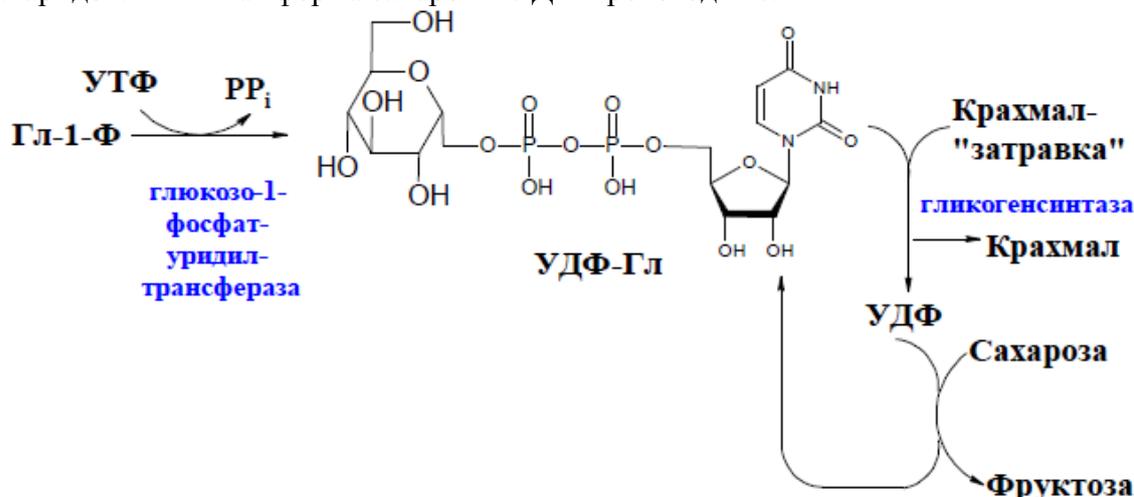


Молекулы НАДФН<sub>2</sub> образуются в пентозофосфатном превращении гексоз. Ацетил-S-КоА может быть получен за счет β-окисления кетогенных аминокислот (лейцин, изолейцин), за счет пируватдегидрогенаной реакции.

При избытке холестерина подавляется активность фермента, катализирующего синтез мевалоновой кислоты.

## 8.2. Синтез полисахаридов

**Синтез крахмала.** Трансгликозилирование – основная реакция в синтезе ди- и полисахаридов. Активная форма сахаров – УДФ-производные.

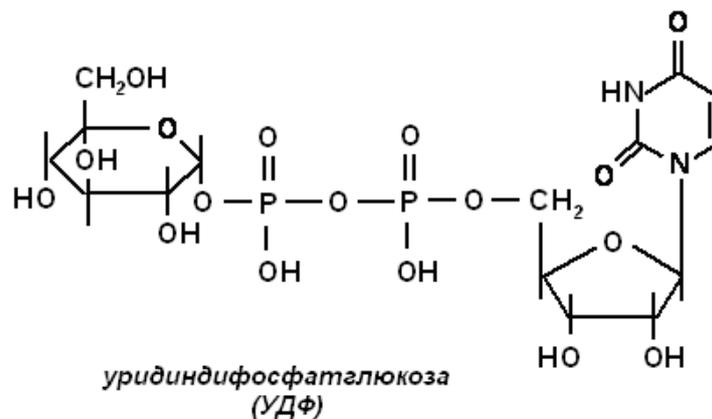


**Гликогенез** – биосинтез гликогена из глюкозы. Он происходит во всех тканях, но энергичнее всего в печени и скелетных мышцах.

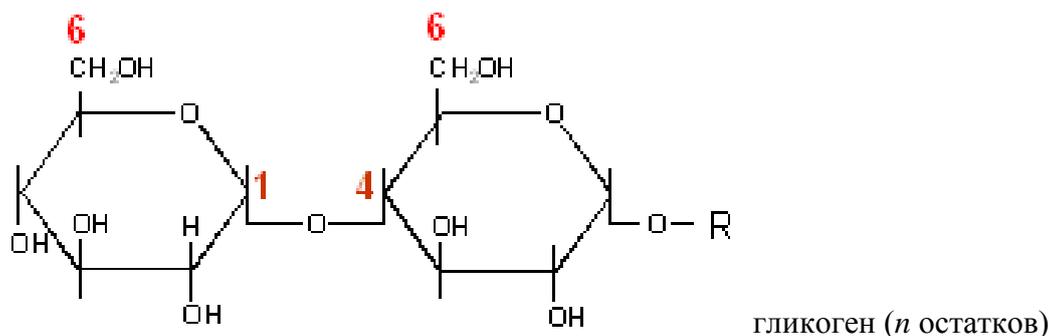
Сначала свободная глюкоза фосфорилируется и становится метаболически активной. Донор такой глюкозы – уридиндифосфатглюкоза (УДФ-глюкоза). Она образуется при взаимодействии глюкозо-1-фосфата и уридинтрифосфата (УТФ):



УДФ-глюкозопирофосфорилаза



При синтезе гликогена УДФ-глюкоза присоединяется к олигосахаридам, которые содержат не менее трех остатков глюкозы, связанных 1,4-гликозидной связью:



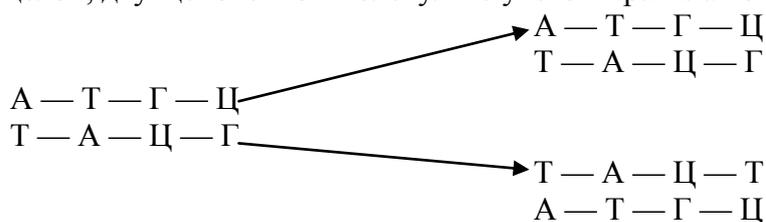
Кроме того, в гликогене остатки глюкозы присоединяются и по вертикали (связи 1,6), в результате образуются ветвления. Молекулярная масса молекулы гликогена –  $1 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^8$ , включает до 1 млн. остатков глюкозы.

*Биологический смысл образования молекулы гликогена:*

- 1) сохранить энергетической материал, необходимый клеткам вне периодов пищеварения;
- 2) препятствовать накоплению осмотически активной глюкозы, способной вызвать разрыв клеточных мембран.

### 8.3. Синтез нуклеиновых кислот

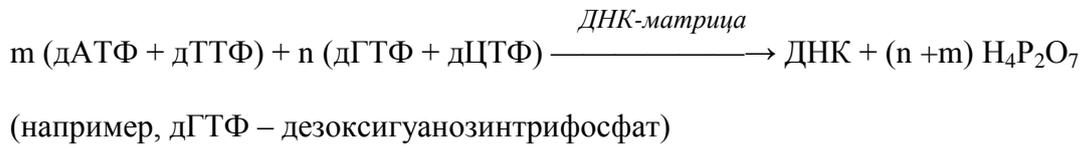
**Биосинтез ДНК (репликация).** Двойная спираль ДНК сначала раскручивается, цепи расходятся, а затем каждая одноцепочечная половина молекулы ДНК достраивается до целой, двухцепочечной молекулы с учетом правила комплементарности:



Такой способ репликации получил название *полуконсервативного*.

Для некоторых бактерий, например, кишечной палочки характерен *консервативный механизм*. При этом дочерние ДНК строятся прямо на двойной спирали ДНК, без ее раскручивания.

*Реакцию синтеза ДНК можно представить схемой:*

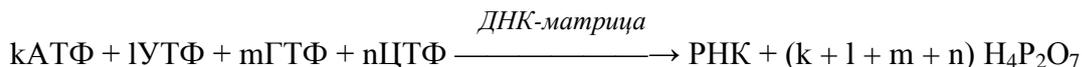


*Для этой реакции характерны следующие особенности:*

- 1) В синтезе ДНК принимают участие трифосфаты дезоксирибонуклеозидов. В ходе этой реакции от каждого из них отщепляется пирофосфат.
- 2) Реакция идет только в присутствии уже готовой ДНК, выполняющей роль матрицы.
- 3) В реакции расходуются одинаковые количества дАТФ и дТТФ, дГТФ и дЦТФ.

### **Биосинтез РНК (транскрипция)**

*Синтез РНК можно представить схемой:*



Для синтеза РНК используются трифосфаты рибонуклеозидов. Роль матрицы выполняет одна из цепей ДНК. Транскрипция катализируется ферментом РНК-полимеразой. В результате получается нить РНК, комплементарная ДНК.

В результате транскрипции образуются предшественники тРНК, рРНК и мРНК. Они имеют избыточные участки по концам нуклеотидной цепи. В ядре происходит созревание (*процессинг*) этих предшественников. При этом избыточные участки отщепляются специфическими ферментами РНКазами.

Созревание мРНК имеет ряд особенностей. Так, в геноме эукариот есть участки ДНК – *интроны*. Они не несут структурной информации, т.е. ген разбит на ряд кусков. При транскрипции получается РНК с участками, комплементарными интронам. В ходе созревания фрагменты, соответствующие интронам, удаляются, а структурные части соединяются (*сплайсинг*).

### **Вопросы для самоконтроля**

- 1) Биосинтез жирных кислот.
- 2) Биосинтез холестерина.
- 3) Синтез крахмала.
- 4) Гликогенез.
- 5) Биосинтез ДНК (репликация).
- 6) Биосинтез РНК (транскрипция).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Коничев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

### *Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
2. Коничев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6
3. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Белок и все о нем: Электронный учебник о химическом составе, строении, свойствах и биологических функциях белковых молекул – [www.Belok-s.narod.ru](http://www.Belok-s.narod.ru)
5. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
6. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 9

### СИНТЕЗ БЕЛКА (ТРАНСЛЯЦИЯ)

#### 9.1. Характеристика стадий, роль нуклеиновых кислот в биосинтезе белка

Для биосинтеза белков нужна белоксинтезирующая система, которая включает: 20 аминокислот; все типы РНК; ионы магния; энергию в виде АТФ и ГТФ; рибосомы; специальные ферменты (аминоацил-тРНК-синтетаза); факторы инициации, элонгации, терминации.

Биосинтез белков отличается от репликации и транскрипции двумя особенностями:

1) нет соответствия между числом нуклеотидов в матрице и числом аминокислот в белке (в мРНК – 4 разных нуклеотида, в белке – 20 разных аминокислот);

2) нуклеотиды и аминокислоты сильно отличаются по строению. Между ними не возможно образование водородных связей типа А—Т и Г—Ц, т.е. между ними нет комплементарности.

Если репликацию и транскрипцию можно сравнить просто с переписываем текста, то трансляция – это дешифрование, декодирование информации об аминокислотной последовательности, которая записана (закодирована) с помощью нуклеотидной последовательности.

Способ шифровки в нуклеиновых кислотах информации о первичной структуре белков называется *биологическим кодом* (генетическим, нуклеотидным, аминокислотным кодом).

Число нуклеотидных остатков, которые кодируют включение в белок одной аминокислоты, называется *кодовым числом*.

Теоретически показано, что код не может состоять из одного нуклеотида, т.к. в этом случае могут кодироваться 4 аминокислоты. При кодовом числе 2 количество разных нуклеотидных пар будет равно числу перестановки из четырех нуклеотидов по 2, т.е.  $4^2 = 16$ , а в состав белка входит 20 аминокислот. Для кодирования всех аминокислот белковой молекулы достаточен триплетный код, когда число возможных комбинаций составит  $4^3 = 64$ .

Экспериментально установлено, что в биологическом коде кодовое число равно трем.

Тройку нуклеотидных остатков (триплет), которые кодируют включение одной аминокислоты, называют *кодоном*.

Каждый триплет кодирует только какую-нибудь одну аминокислоту. Это свойство кода называется *специфичностью*. Одна аминокислота может кодироваться двумя или большим числом (до шести) разных триплетов, т.е. генетический код для аминокислот является *вырожденным*.

К настоящему времени биологический код изучен у большого количества разных организмов – от вирусов и бактерий до высших животных. Во всех случаях он оказался одинаковым, что свидетельствует о единстве происхождения жизни на Земле.

Из 64 триплетов 61 используется для кодирования аминокислот, а три – *UAA, UAG и UGA* – обозначают конец матрицы, т.е. на них обрывается наращивание пептидной цепи. Это *терминирующие триплеты*.

**В процессе образования пептидной цепи выделяют три стадии:**

1) *Инициация* (начало)

Синтез белка начинается с образования иницирующего комплекса. мРНК после созревания в ядре выходит в цитоплазму и связывается с малой (40S) субъединицей рибосомы и метиониновой тРНК (*Мет-тРНК<sup>Мет</sup>*). Затем к этому комплексу присоединяется большая (60S) субъединица рибосом и 8 вне ribосомных белков – факторов инициации. *Мет-тРНК<sup>Мет</sup>* взаимодействует своим антикодоном с кодонами АУГ или ГУГ на мРНК. Это *иницирующие кодоны*, с них начинается синтез любого белка.

### 2) Элонгация (удлинение)

В этой стадии выделяют три этапа:

1. к иницирующему комплексу присоединяется вторая тРНК, несущая аминокислоту. В этой реакции участвует вне ribосомный белок – фактор элонгации EF1;
2. образование пептидной связи;
3. транслокация – перемещение рибосомы относительно мРНК. При этом присоединяются белки элонгации, освобождается *Мет-тРНК<sup>Мет</sup>* и рибосома сдвигается. Образуется дипептид. После этого присоединяется следующая тРНК с аминокислотой.

Пептид из 100 аминокислот синтезируется примерно за 2 минуты.

### 3) Терминация (окончание)

Удлинение пептидной цепи продолжается до тех пор, пока на пути рибосомы не встретится один из терминирующих триплетов РНК – УАА, УАГ или УГА. В области этих триплетов при участии вне ribосомных белков – факторов терминации – происходит гидролитическое расщепление связи между пептидом и последней тРНК, и освобождается готовый белок.

На включение в белок каждой аминокислоты расходуется 1 молекула АТФ и 3 молекулы ГТФ.

После того, как белок сошел с мРНК, происходит его созревание или *посттрансляционная достройка*:

#### 1) протеолиз – отщепление пептидов с N- или C-конца.

Например, инсулин образуется из предшественника проинсулина путем отщепления пептида из 33 аминокислотных остатков с C-конца.

#### 2) химическая модификация

Например, при формировании молекул коллагена происходит гидроксилирование остатков лизина и пролина.

#### 3) присоединение протетической группы или нескольких протомеров

Таким образом, первичная, вторичная третичная структура белков формируются в процессе трансляции по мере удлинения пептидной цепи, а четвертичная – в цитоплазме в процессе посттрансляционной достройки.

## 9.2. Регуляция синтеза белка

**Ингибиторы матричных биосинтезов.** Если матричные биосинтезы будут подавлены, то клетка погибнет. К ингибиторам относят многие антибиотики – вещества, которые выделяют главным образом из микроскопических грибов.

Антибиотики делят на:

- 1) *Противоопухолевые антибиотики* – подавляют репликацию или транскрипцию. Не обладают избирательным действием и могут взаимодействовать с ДНК, выделенной как из нормальных, так и из опухолевых клеток. Избирательность в их действии основана на различной проницаемости клеточных мембран или особенностях метаболизма. При лечении могут повреждаться и здоровые клетки.

Например, *митомицин С* образует ковалентные сшивки между цепями ДНК. Ингибирует синтез ДНК.

2) *Противобактериальные антибиотики* – ингибируют трансляцию. Они обладают высокой избирательностью и сравнительно мало токсичны для человека. Это объясняется тем, что у бактерий рибосомы и входящие в их состав ферменты и другие белки, отличаются по строению от рибосом и соответствующих белков эукариот.

Например, *стрептомицин* соединяется с малой субъединицей рибосом, нарушая ее функции.

Развитие многих вирусных инфекций связано с ингибированием матричных биосинтезов: дифтерии, оспы, гриппа и т.д.

**Регуляция биосинтеза белков.** Биосинтез белков находится под регулирующим влиянием нервной и эндокринной системы, питания, физиологического состояния организма, климатических и экологических условий и т.д.

*В клетках животных выделяют два типа регуляции деятельности ДНК:*

1. кратковременная, адаптивная индукция и репрессия. Она возникает при изменении концентрации какого-либо метаболита;

2. длительная индукция и репрессия. Она сохраняется на протяжении всей жизни клетки.

Известны механизмы регуляции синтеза белка у бактерий, главным образом, на уровне транскрипции. Подробнее всего разработана регуляция транскрипции на уровне лактозного оперона. Гипотезу оперона сформулировали ученые Ф. Жакоб, Ж. Моно, А. Львов (Франция). Оперон – это участок ДНК, в котором имеются структурные гены определенных белков и регуляторные участки (оператор, промотор, ген-регулятор).

На опероне имеется участок нуклеотидов (промотор), с которым связывается РНК-полимераза. При движении РНК-полимеразы по оперону транслируются структурные гены и образуются следующие ферменты:

1)  $\beta$ -галактозидаза (лактаза) – катализирует первую стадию расщепления лактозы;

2) пермеаза – мембранный белок, способствует транспорту  $\beta$ -галактозидов из внешней среды в клетку;

3) галактозидтрансацетилаза – считают, что он играет важную роль в процессе метаболической утилизации галактозидов.

На регуляторном участке оперона находится ген-регулятор. При его транскрипции образуется соответствующая мРНК. На этой матрице синтезируется белок-регулятор, который может связываться как с оператором оперона, так и с лактозой. При связи этого белка с оператором блокируется транскрипция структурных генов, а при связи с лактозой, напротив, его сродство к оператору утрачивается.

Если в среде имеется лактоза, то белок-регулятор связан с ней, оператор при этом свободен и возможен синтез ферментов, необходимых для утилизации углевода. Однако если в среде лактозы нет, то белок-регулятор соединяется с оператором, транскрипция невозможна и ферменты катаболизма лактозы не синтезируются.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Характеристика стадий биосинтеза белка.
- 2) Роль нуклеиновых кислот в биосинтезе белка.
- 3) Ингибиторы матричных биосинтезов.
- 4) Регуляция биосинтеза белков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Коничев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

### *Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
2. Коничев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6
3. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Белок и все о нем: Электронный учебник о химическом составе, строении, свойствах и биологических функциях белковых молекул – [www.Belok-s.narod.ru](http://www.Belok-s.narod.ru)
5. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
6. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 10

### РЕГУЛЯТОРНЫЕ СИСТЕМЫ ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ

#### 10.1. Уровни регуляции

Многие характеристики организма сохраняются неизменными на протяжении длительного времени. Например, концентрация глюкозы в крови одного и того же человека после сна натошак, день за днем, месяц за месяцем остается практически постоянной. Постоянство свойств организма называют *гомеостазом*.

Кроме того, для организма характерны изменения ряда параметров, которые происходят в определенном направлении и имеют определенную величину:

**1. Онтогенез.** В процессе онтогенеза происходит:

- включение и выключение действия разных генов в определенной последовательности;
- изменение метаболических процессов, белкового состава, морфологии, функционального состояния органов.

Ход онтогенеза закономерный, одинаковый для всех особей вида. Следовательно, есть механизмы управления этим процессом.

**2. Циклические изменения (биоритмы)** – сезонные изменения концентрации холестерина в крови, месячный половой цикл у женщин.

**3. Изменение физиологической активности** – изменение двигательной активности, функционального состояния органов чувств и др. В их основе лежат регулируемые изменения биохимических процессов.

**4. Адаптивные изменения организма** – вызваны внешними факторами. Например, увеличение теплопродукции на холоде, увеличение концентрации гемоглобина в крови при низком содержании кислорода в воздухе.

**5. Реакция на повреждающие агенты внешней среды** – образование тромбов при повреждении кровеносных сосудов, заживление ран, воспалительная реакция, индукция синтеза антител антигенами.

#### Уровни регуляции внутренней среды организма

**1) Внутриклеточный**

- изменение активности ферментов путем ингибирования или активации;
- изменение количества ферментов и других белков путем индукции или репрессии их синтеза или путем изменения скорости их распада;
- изменение скорости трансмембранного переноса веществ.

**2) Гормональный** – клетки желез эндокринной системы выделяют в кровь или лимфу химические регуляторы – гормоны.

**3) Нервный** – включает нервную систему с рецепторами сигналов внешней и внутренней среды. Поступившие сигналы трансформируются в нервный импульс, который вызывает освобождение химического сигнала – медиатора. Медиатор через внутриклеточные механизмы регуляции вызывает изменение обмена веществ.

#### 10.2. Регуляция активности ферментов

**Активаторы и ингибиторы ферментов.** Известны различные соединения, которые повышают или понижают активность энзимов.

*Различают активаторы:*

1) специфические

Например, неактивный пепсиноген под влиянием пепсина желудочного сока превращается в активный пепсин – аутокатализ.

2) неспецифические (оптимальная температура, pH, концентрация солей и пр.).

Например, ионы хлора активируют амилазу слюны, ионы водорода – пепсин, ионы цинка – карбоангидразу, желчные кислоты – липазу и т.д.

**Ингибиторы** – вещества, которые снижают активность ферментов. Различают ингибиторы: необратимые и обратимые.

При *необратимом ингибировании* ингибитор вызывает стойкие изменения пространственной третичной структуры молекулы фермента или модификацию функциональных групп фермента. Например, диизопропилфторфосфат обладает высокой токсичностью, т.к. подавляет активность эластазы, ацетилхолинэстеразы, химотрипсина.

*Обратимое ингибирование* разделяют на конкурентное и неконкурентное.

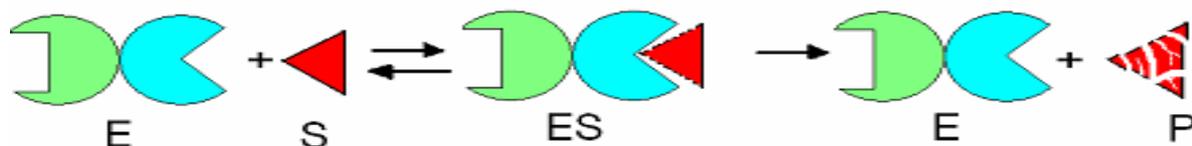
Конкурентные ингибиторы присоединяются к активному центру фермента, образуя с ним фермент-ингибиторный центр (*EI*). При повышении концентрации субстрата ингибитор вытесняется из активного центра фермента.

Неконкурентные (или бесконкурентные) ингибиторы связываются с фермент-субстратным комплексом (*ESI*) и не могут быть отделены избытком субстрата.

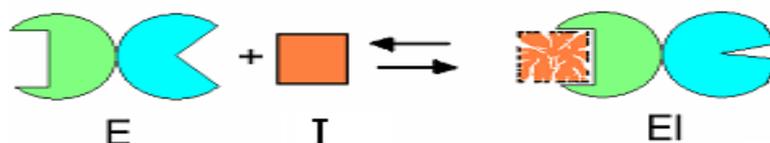
### Регуляция активности ферментов

1) *Аллостерическая регуляция* (с греч. *allos* – другой, *stereos* – место или пространство). При этом метаболит присоединяется не к активному центру, а к другому участку фермента. В результате этого изменяется конфигурация молекулы фермента, а значит и активного центра, который поэтому не может выполнить своих функций.

Аллостерические ферменты построены, как правило, их двух и более субъединиц. Если в среде нет аллостерического ингибитора, то субстрат присоединяется к каталитическому активному центру и происходит реакция:



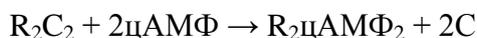
Если в среде есть аллостерический ингибитор, то он присоединяется к регуляторному центру, что ведет к изменению регуляторной субъединицы, а, следовательно, и каталитической:



2) *Регуляция путем фосфорилирования и дефосфорилирования*. Например, липаза, присоединяя фосфат, превращается в более активную фосфолипазу.

3) *Регуляция белковыми ингибиторами*. Например, все белки фосфорилируются ферментом протеинкиназой. Протеинкиназа в активной форме – это белок, построенный из одной пептидной цепи (субъединица С). В клетке есть белок (субъединица R),

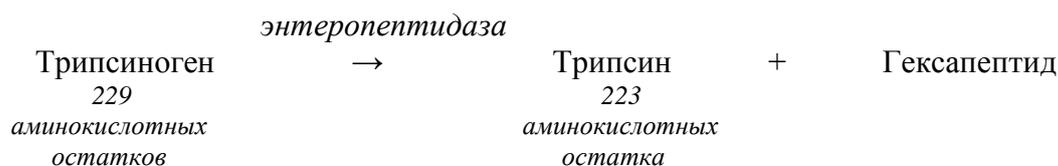
который может соединяться с белком  $C$  с образованием тетрамерного комплекса  $R_2C_2$ . Этот комплекс обладает ферментативной активностью. Фермент активируется при участии цАМФ: после присоединения цАМФ изменяется конформация белка, сродство субъединицы  $R$  к субъединице  $C$  уменьшается – комплекс диссоциирует:



Реакция обратима, поэтому при повышении концентрации цАМФ в клетке протеинкиназы активируются, при снижении – наоборот.

4) *Регуляция частичным протеолизом.* Многие ферменты вырабатываются в организме в неактивной форме, т.е. в виде проферментов. Это необходимо для того, чтобы не разрушались собственные ткани организма. При необходимости от неактивной формы фермента отщепляется какой-либо остаток аминокислот, и появляется фермент в активной форме.

Например, в клетках поджелудочной железы синтезируется трипсиноген, который секретируется в панкреатический сок, выводящийся в двенадцатиперстную кишку. Клетки кишечника выделяют протеолитический фермент энтеропептидазу, который отщепляет гексапептид с  $N$ -конца молекулы трипсиногена:



### 10.3. Регуляция репликации ДНК и транскрипции

**Регуляция процесса репликации ДНК** наиболее строго осуществляется на этапе инициации. Репликация находится под положительным и отрицательным контролем, причем оба они скоординированы с клеточным делением.

В общих чертах принцип такой регуляции можно сформулировать следующим образом. При **положительном контроле** происходит накопление активатора репликации до порогового, достаточного для инициации нового цикла репликации уровня. Пороговый уровень достигается при удвоении клеточной массы так, чтобы во вновь образовавшихся клетках процесс репликации был бы уже запущен и успел завершиться к моменту нового деления. При **отрицательном контроле** происходит накопление ингибитора инициации репликации, который должен синтезироваться лишь в ограниченном количестве вскоре после начала предыдущего цикла репликации. Такой ингибитор может быть продуктом гена, локализованного вблизи от точки начала репликации, транскрипция которого осуществляется только в период репликации данного участка ДНК. В процессе роста клетки ингибитор «разбавляется», а к моменту удвоения массы клетки уровень его падает ниже критического, что позволяет клетке инициировать новый цикл репликации. Взаимодействие этих двух механизмов и должно координировать процессы репликации ДНК и деления клетки.

Реальные механизмы регуляции репликации еще не расшифрованы. У эукариот определенную роль в регуляции репликации, по-видимому, играют гистоны.

**Регуляция транскрипции.** Исходя из возможности управления синтезом белковых посредников на этапе транскрипции, их можно разделить на три основные группы:

1. *конститутивные белки*, синтез которых не зависит от наличия субстратов и продуктов;
2. *индуцибельные белки* – их синтез ускоряется в присутствии субстратов;
3. *репрессибельные белки*, синтез которых подавляется избытком конечного продукта данного метаболического пути.

На стадии инициации регуляция транскрипции осуществляется благодаря наличию особых белков-регуляторов, способных присоединяться к определенным участкам ДНК и тем самым препятствовать или помогать РНК-полимеразе инициировать синтез РНК на промоторе.

У прокариот регуляция транскрипции часто осуществляется на стадии терминации в особых терминаторах (называемых аттенуаторами), расположенных в начале или внутри оперонов.

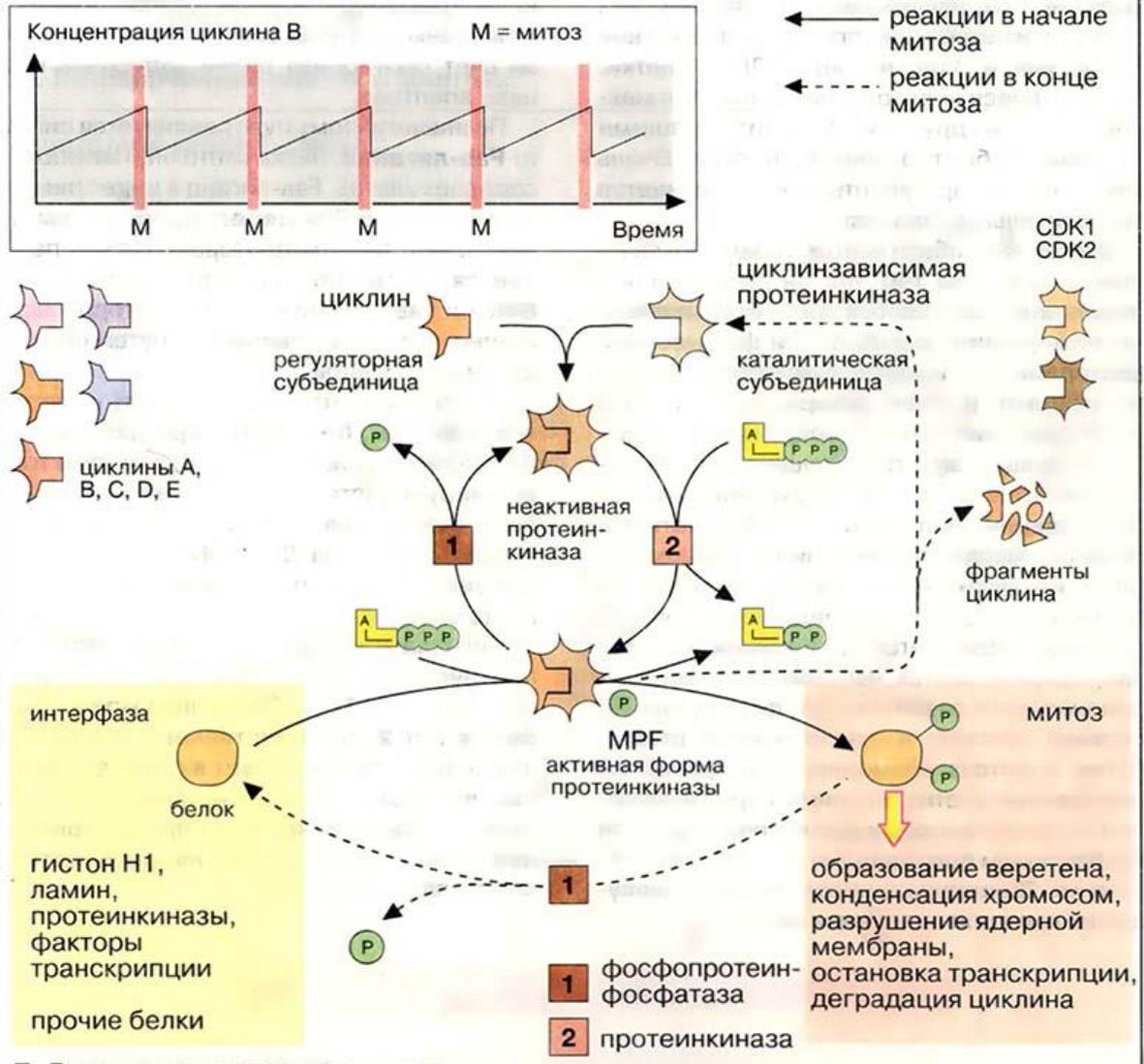
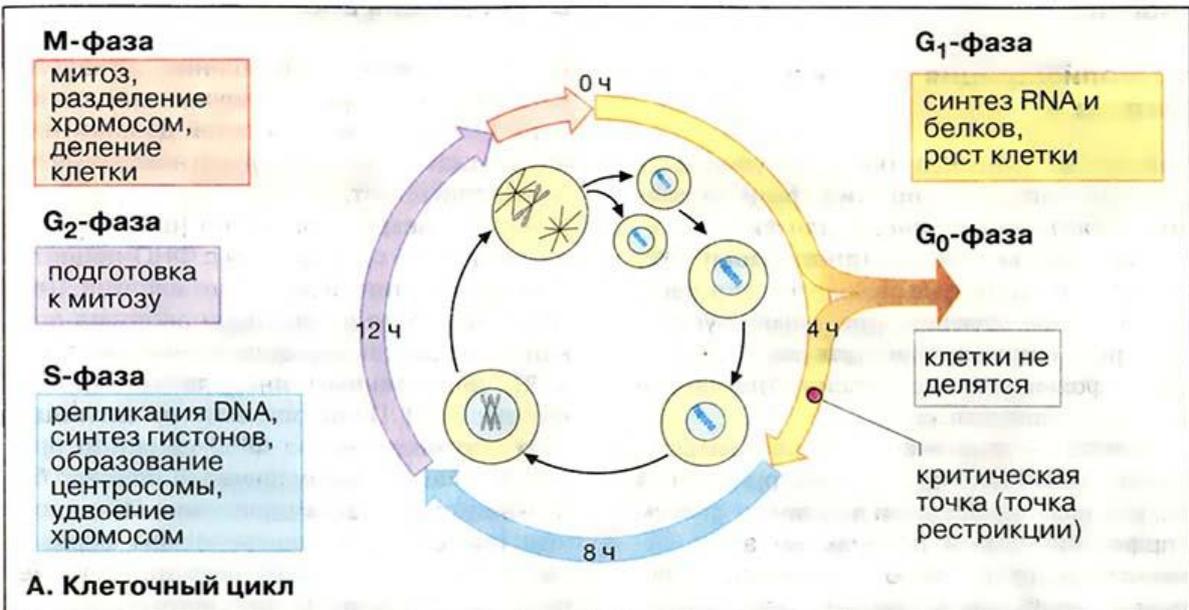
#### 10.4. Регуляция клеточного деления

Регуляция клеточного цикла осуществляется посредством обратимого фосфорилирования/дефосфорилирования регуляторных белков. Белком, регулирующим вступление клетки в митоз (G2/M-переход), является специфическая серин/треонин-протеинкиназа, которая носит название фактор созревания (ФС). В активной форме фермент катализирует фосфорилирование многих белков, принимающих участие в митозе, таких, например, как входящий в состав хроматина гистон H1, ламин (компонент цитоскелета, обнаруженный в ядерной мембране), факторы транскрипции, белки митотического веретена и ряд ферментов. Фосфорилирование этих белков запускает процесс митоза. После завершения митоза регуляторная субъединица ФС, циклин, маркируется убиквитином и подвергается протеолизу. Теперь наступает очередь протеин-фосфатаз, которые дефосфорилируют белки, принимавшие участие в митозе, после чего клетка возвращается в состояние интерфазы.

ФС – гетеродимерный фермент, включающий регуляторную субъединицу, циклин, и каталитическую субъединицу, циклинзависимую киназу (ЦЗК). Активной формой фермента является лишь димер ЦЗК+циклин. Кроме того, активность протеинкиназы регулируется путём обратимого фосфорилирования самого фермента (на схеме представлен предельно простой вариант этого процесса)..

В клетках позвоночных присутствует ряд различных циклинов и циклинзависимых киназ. Разнообразные сочетания двух субъединиц фермента регулируют запуск митоза, начало процесса транскрипции в G1-фазе, переход критической точки после завершения транскрипции, начало процесса репликации ДНК в S-периоде интерфазы (стартовый переход) и другие ключевые переходы клеточного цикла.

В ооцитах лягушки, например, вступление в митоз (G2/M-переход) регулируется путём изменения концентрации циклина. Циклин непрерывно синтезируется в интерфазе до достижения максимальной концентрации в фазе М, когда запускается весь каскад фосфорилирования белков, катализируемый ФС. К окончанию митоза циклин быстро разрушается протеиназами, также активируемыми ФС. В других клеточных системах активность ФС регулируется за счёт различной степени фосфорилирования самого фермента.



**Взаимодействие регуляторных механизмов при управлении скоростью роста микроорганизмов.** В хемостатной культуре регулирование состава среды позволяет получить клетки определенного химического состава, а иногда и с заранее заданными свойствами. Например, для получения клеток, обогащенных белком, но со сниженным содержанием нуклеиновых кислот целесообразно использовать лимитирование по фосфору.

При обогащении среды, допустим, путем добавления дополнительных питательных веществ, а в хемостатной культуре путем увеличения протока среды, скорость роста увеличивается до нового значения, которое, как правило, не является максимально возможным в силу неполной реализации потенциала клетки. Это происходит из-за наличия так называемых узких мест, т.е. биохимических реакций, ограничивающих скорость всего процесса, а выявляя их, можно получить максимальный выход биомассы и ценных для человека продуктов метаболизма.

Таблица 10.1

Влияние различных видов лимитирования на состав клеток микроорганизма (типа *Escherichia coli*)

Лимитируемый источник	Состав клеток			
	Белок	Нуклеиновые кислоты	Липиды	Запасные вещества
Углерод	Не влияет	Не влияет	Снижает	Снижает
Азот	Снижает	Снижает	Повышает	Повышает
Фосфор	Не влияет или повышает	Снижает	Снижает	Повышает
Цинк	Не влияет	Снижает	Не влияет	Не влияет

Обычно скорость транспорта субстратов более или менее точно сбалансирована со скоростью их метаболизма, а иногда превышает ее. В последнем случае в клетке формируется резерв субстратов, способный оказывать разнообразное, в том числе тормозящее, действие на метаболизм клетки, если отсутствует трансрегуляторное ингибирование транспорта этих субстратов из среды их внутриклеточным пулом. При некоторых условиях транспорт оказывается лимитирующим этапом метаболизма, например, при дефиците в среде необходимых субстратов и кофакторов, особенно в случае организмов, не способных к синтезу данных веществ или осуществляющих эти процессы с пониженной скоростью. Аналогичная ситуация создается при недостаточной эффективности транспортных систем, даже если в среде избыток субстрата. Этап выделения продуктов может лимитировать рост, если продукт обладает ингибиторным или отрицательным регуляторным действием на метаболизм. В клетке при этом может вырабатываться специальный механизм для активного удаления таких веществ.

В тех случаях, когда транспортный процесс становится узким местом, лимитирующим общую скорость метаболизма, воздействие, активирующее транспорт или повышающее избирательную проницаемость клеточной оболочки, может положительно влиять на скорость роста организма. Этап функционирования ферментов может оказаться рост-лимитирующим звеном метаболизма лишь при отсутствии в клетке необходимого количества фермента. При этом быстро включаются компенсирующие механизмы: наступает индукция фермента или снимается репрессия его синтеза. Для конститутивных ферментов возможна стимуляция на уровне трансляции. Только при недостаточной эффективности всех этих регуляторных механизмов количество фермента

может оказаться неадекватным условиям роста.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие «гемеостаз».
- 2) Механизмы управления онтогенезом.
- 3) Уровни регуляции внутренней среды организма.
- 4) Активаторы и ингибиторы ферментов.
- 5) Регуляция активности ферментов.
- 6) Регуляция процесса репликации ДНК.
- 7) Регуляция транскрипции.
- 8) Регуляция клеточного деления.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
3. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
5. Коничев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
6. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
8. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
9. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
10. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
11. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
12. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

13. Филлипович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
14. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

*Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
2. Коницев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6
3. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Белок и все о нем: Электронный учебник о химическом составе, строении, свойствах и биологических функциях белковых молекул – [www.Belok-s.narod.ru](http://www.Belok-s.narod.ru)
6. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
7. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 11

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

### 11.1. Природа генетического материала

Генетический материал – компоненты клетки, структурно-функциональное единство которых обеспечивает хранение, реализацию и передачу наследственной, информации при вегетативном и половом размножении.

Генетический материал обладает универсальными для всего живого свойствами: дискретностью, непрерывностью, линейностью, относительной стабильностью.

*Дискретность генетического материала*, т. е. существование гена, хромосомы (группы сцепления), генома выявляют в виде: множества аллелей данного гена; множества генов, составляющих группу сцепления; множества групп сцепления, составляющих геном.

*Непрерывность генетического материала* (физическая целостность хромосомы) выявляют в виде сцепления множества генов между собой.

*Линейность генетического материала* (одномерность записи генетической информации) – в определенной последовательности генов в пределах группы сцепления или сайтов в пределах гена.

*Относительная стабильность генетического материала* или способность к конвариантной редупликации, т. е. возникновение и сохранение вариантов в ходе воспроизведения, выявляют в виде мутационной изменчивости. Всеми этими свойствами в клетке обладают молекулы ДНК или реже РНК (у некоторых вирусов), в которых и закодирована наследственная информация.

### 11.2. Генетический код и его свойства

*Генетический код* – это свойственный всем живым организмам способ кодирования аминокислотной последовательности белков при помощи последовательности нуклеотидов.

В ДНК используется четыре нуклеотида – аденин (А), гуанин (G), цитозин (С), тимин (Т), которые в русскоязычной литературе обозначаются буквами А, Г, Ц и Т. Эти буквы составляют алфавит генетического кода. В РНК используются те же нуклеотиды, за исключением тимина, который заменён похожим нуклеотидом – урацилом, который обозначается буквой U (У – в русскоязычной литературе). В молекулах ДНК и РНК нуклеотиды выстраиваются в цепочки и, таким образом, получают последовательности генетических букв.

Для построения белков в природе используется 20 различных аминокислот. Каждый белок представляет собой цепочку или несколько цепочек аминокислот в строго определённой последовательности. Эта последовательность определяет строение белка, а следовательно все его биологические свойства. Набор аминокислот также универсален для почти всех живых организмов.

Реализация генетической информации в живых клетках (то есть синтез белка, кодируемого геном) осуществляется при помощи двух матричных процессов: транскрипции (то есть синтеза иРНК на матрице ДНК) и трансляции генетического кода в аминокислотную последовательность (синтез полипептидной цепи на матрице иРНК). Для кодирования 20 аминокислот, а также сигнала «стоп», означающего конец белковой после-

довательности, достаточно трёх последовательных нуклеотидов. Набор из трёх нуклеотидов называется триплетом.

***Свойства генетического кода:***

Триплетность – значащей единицей кода является сочетание трёх нуклеотидов (триплет, или кодон).

Непрерывность – между триплетами нет знаков препинания, то есть информация считывается непрерывно.

Неперекрываемость – один и тот же нуклеотид не может входить одновременно в состав двух или более триплетов. Не соблюдается для некоторых перекрывающихся генов вирусов, митохондрий и бактерий, которые кодируют несколько белков, считывающихся со сдвигом рамки.

Однозначность – определённый кодон соответствует только одной аминокислоте. Свойство не является универсальным. Кодон UGA у *Euplotes crassus* кодирует две аминокислоты – цистеин и селеноцистеин.

Вырожденность (избыточность) – одной и той же аминокислоте может соответствовать несколько кодонов.

Универсальность – генетический код работает одинаково в организмах разного уровня сложности – от вирусов до человека (на этом основаны методы генной инженерии).

### **11.3. Механизмы репарации ДНК**

*Репарация* (от лат. *reparatio* – восстановление) – особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, повреждённой при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических агентов. Осуществляется специальными ферментными системами клетки.

*Источники повреждения:* ультрафиолетовое излучение, радиация, химические вещества, ошибки репликации ДНК, апуринизация – отщепление азотистых оснований от сахарофосфатного остова, дезаминирование – отщепление аминогруппы от азотистого основания.

*Основные типы повреждения ДНК:* повреждение одиночных нуклеотидов, повреждение пары нуклеотидов, разрыв цепи ДНК, образование поперечных сшивок между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК.

*Устройство системы репарации:*

Каждая из систем репарации включает следующие компоненты:

- хеликаза – фермент, «узнающий» химически изменённые участки в цепи и осуществляющий разрыв цепи вблизи от повреждения;
- фермент, удаляющий повреждённый участок;
- ДНК-полимераза – фермент, синтезирующий соответствующий участок цепи ДНК взамен удалённого;
- ДНК-лигаза – фермент, замыкающий последнюю связь в полимерной цепи и тем самым восстанавливающий её непрерывно.

*Типы репарации:*

У бактерий имеются по крайней мере 3 ферментные системы, ведущие репарацию – прямая, эксцизионная и пострепликативная. У эукариот к ним добавляется еще mismatch-репарация и Sos-репарация.

*Прямая репарация* – наиболее простой путь устранения повреждений в ДНК, в ко-

тором обычно задействованы специфические ферменты, способные быстро (как правило, в одну стадию) устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов. Так действует, например, Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, которая снимает метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина.

*Эксцизионная репарация* (англ. *excision* – вырезание) включает удаление повреждённых азотистых оснований из ДНК и последующее восстановление нормальной структуры молекулы.

*Пострепликативная репарация* – тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения: после репликации с образованием ДНК, содержащей поврежденные участки, образуются одноцепочечные бреши, заполняемые в процессе гомологичной рекомбинации при помощи белка RecA.

*Пострепликативная репарация* была открыта в клетках *E.coli*, не способных выщеплять тиминовые димеры. Это единственный тип репарации, не имеющий этапа узнавания повреждения.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие «генетический материал».
- 2) Свойства генетического материала.
- 3) Генетический код.
- 4) Свойства генетического кода.
- 5) Репарация.
- 6) Источники повреждения.
- 7) Основные типы повреждения.
- 8) Устройство системы репарации.
- 9) Типы репарации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
4. Коничев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
5. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. Филлипович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И.

Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

8. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

*Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)

2. Коницев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6

3. Курбатова, Н.С. Учебное пособие по общей биологии [Электронный ресурс] / Н.С. Курбатова, Е.А. Козлова. – Саратов: Научная книга, 2012. – 160 с. – ISSN 2227-8397 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

4. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

5. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

6. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 12

### ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ ГЕНА

#### 12.1. Цис- и транскомплементационный тест

**Комплементационный тест** (complementation test) [лат. complementum – дополнение; англ. test – испытание, исследование] – генетический прием, устанавливающий аллельность или неаллельность двух мутаций со сходным фенотипом, который заключается в скрещивании гомозиготных организмов по каждой из мутаций: в случае аллельных мутаций потомство будет иметь мутантный фенотип, а в случае неаллельных – фенотип дикого типа.

Напомним, что аллелями называют формы одного и того же гена, возникающие в результате его мутационной изменчивости. Аллели дикого типа, как правило, доминантные, мутантные аллели обычно рецессивны. Гетероаллели – различаются по типу и (или) локализации, изоаллели (когда в гомологичных точках содержатся одинаковые, но противоположно ориентированные в отношении цепей ДНК пары нуклеотидов), гомоаллели (когда в гомологичных точках аллелей в той же ориентации расположены одинаковые пары нуклеотидов).

Для того, чтобы две мутации,  $a_1$  и  $a_2$  могли быть исследованы с помощью цис-транс-теста они должны оказаться в одной клетке в одной, из двух возможных конфигураций по отношению друг к другу. Организм или клетку, несущую обе мутации в цис-положении, т.е. в одной хромосоме, называют цис-гетерозиготой. Расположение этих мутаций в разных хромосомах одной пары (у эукариот) означает, что они находятся в транс-конфигурации в составе транс-гетерозиготы. Поскольку речь идет о рецессивных мутациях, цис-гетерозигота будет иметь дикий фенотип, независимо от того, находятся ли мутации в разных аллелях одного гена, или разных генах. В транс-гетерозиготе результат будет различен. Если мутации расположены в разных генах, фенотип будет диким, если же обе мутации затрагивают одну единицу функции, возникает гомозигота с мутантным фенотипом, так как в гомологичных хромосомах мутантные одинаковые гены.

#### 12.2. Генетическое картирование

Генетическое картирование – это определение группы сцепления и положения картируемого гена относительно других генов данной хромосомы. Чем больше генов известно у данного вида, тем точнее результаты этой процедуры. Как правило, число генов в группах сцепления зависит от линейных размеров соответствующих хромосом. Однако, протяженные области конститутивного гетерохроматина (в районе центромеры и теломерных участков) практически не содержат генов и, таким образом, нарушают эту зависимость.

На **первом этапе картирования** определяют принадлежность гена к той или иной группе сцепления. Как известно, у *D. melanogaster* в диплоидном наборе четыре пары хромосом: первая пара – половые хромосомы (XX – у самок, XY – у самцов), вторая, третья и четвертая – аутосомы. Число генов в Y-хромосоме самцов очень мало. Для локализации вновь возникшей мутации необходимо располагать набором маркерных генов для каждой хромосомы. Картирование мутации основывается на анализе ее сцепления с этими маркерами. Например, если интересующая нас мутация наследуется не-

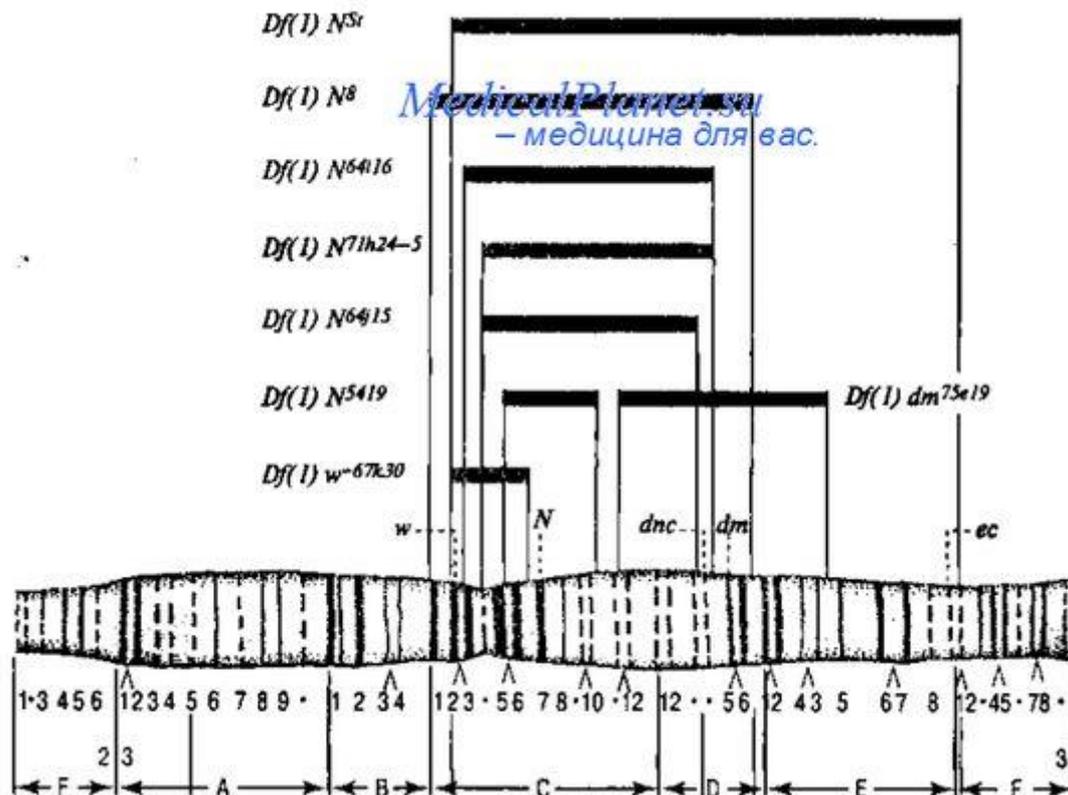
зависимо от маркеров второй хромосомы, делается вывод о ее принадлежности к другой группе сцепления. Скрещивания проводятся до тех пор, пока не удастся выявить сцепленное наследование анализируемой мутации с маркерными мутациями какой-либо хромосомы.

**Второй этап картирования** подразумевает определение положения гена на хромосоме. Для этого подсчитывают расстояние между этим геном и уже известными, маркерными генами. Для подсчета генетических расстояний проводят специальные скрещивания, в потомстве которых учитывают частоты кроссоверных и некриссоверных особей. Предполагается, что расстояние между двумя генами пропорционально частоте кроссинговера между ними. Следует иметь в виду, что, чем дальше расположены друг от друга гены, тем чаще между ними происходят множественные перекресты и тем больше искажается истинное расстояние между этими генами.

Частая рекомбинация между расположенными далеко друг от друга генами может привести к увеличению числа кроссоверных организмов в потомстве анализирующего скрещивания до 50%, имитируя независимое наследование изучаемых признаков. Поэтому при составлении карт расстояния между далеко расположенными генами следует использовать не непосредственный подсчет числа кроссоверных особей в анализирующих скрещиваниях, а сложение расстояний между многими близко расположенными друг от друга генами, находящимися внутри изучаемого протяженного участка. В этом случае сцепление между далеко расположенными генами можно установить по их сцепленному наследованию с промежуточно-расположенными генами, которые в свою очередь сцеплены между собой. В результате такого метода определения расстояний между генами длины карт хромосом могут превышать 50 морганид. Так, у дрозофилы генетическое расстояние между генами, лежащими в разных концах хромосомы 2, составляет 107 морганид.

**Метод цитологических карт** основан на использовании хромосомных перестроек. При облучении и действии других мутагенов в хромосомах часто наблюдаются потери (делеции) или вставки (дупликации) небольших фрагментов, сравнимых по величине с одним или несколькими локусами. Например, можно использовать гетерозиготы по хромосомам, одна из которых будет нести группу следующих друг за другом доминантных аллелей, а гомологичная ей — группу рецессивных аллелей тех же генов ABCDE/abcde. Если в хромосоме с доминантными генами произошла утрата отдельных генов, например DE, то у гетерозиготы ABC/abcde будут проявляться рецессивные признаки de. На этом принципе основан метод перекрывающихся делеций, используемый при построении цитологических карт.

Например, у дрозофилы составлены цитологические карты политенных хромосом. Напомним, что при окраске этих хромосом, в тысячу раз превышающих по размерам митотические хромосомы, на препаратах выявляются темно-окрашенные диски и светлые участки — междиски. При этом каждая хромосома имеет свой индивидуальный рисунок чередования различных дисков (толстых, тонких, пунктирных) и междисков, что позволяет отличить одну хромосому от другой и разные участки одной хромосомы. На политенных хромосомах можно четко определять концы делеций. На рисунке приведены длины и расположение восьми делеций в X-хромосоме. У гетерозигот по рецессивной мутации w будет проявляться признак белые глаза только при утрате нормального аллеля в гомологичной хромосоме. Так, у мух Df(I)N/w проявляется фенотип белые глаза, а у Df(I)N64il6/w — глаза красные.



Следовательно, ген *white* расположен в общем для трех делеций участке 3C2-3C6 и левее дистального конца (ближе к теломере) делеций *Df(t)N64i16*. Цитологические карты хромосом можно также строить с использованием транслокаций и инверсий. Первые цитологические карты хромосом *D. melanogaster* составлены Ф.Добжанским. Метод перекрывающихся делеций использовал С. Бензер при внутригенном картировании мутаций у фага T4.

### 12.3. Секвенирование

**Секвенирование** (sequencing) – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. В настоящее время нет ни одного метода секвенирования, который бы работал для молекулы ДНК целиком; все они устроены так: сначала готовится большое число небольших участков ДНК (клонировается молекула ДНК многократно и «разрезается» её в случайных местах), а потом читается каждый участок по отдельности.

Клонирование происходит либо просто выращиванием клеток в чашке Петри, либо при помощи так называемой полимеразной цепной реакции. Сначала ДНК денатурируют, т.е. разрушают водородные связи, получая отдельные нити. Затем к ДНК присоединяют так называемые праймеры; это короткие участки ДНК, к которым может присоединиться ДНК-полимераза – соединение, которое, собственно, и занимается копированием (репликацией) нити ДНК. На следующем этапе полимераза копирует ДНК, после чего процесс можно повторять: после новой денатурации отдельных нитей будет уже вдвое больше, на третьем цикле – вчетверо, и так далее.

Все эти эффекты достигаются в основном с помощью изменений температуры смеси из ДНК, праймеров и полимеразы; на выходе получается большое число копий участков одной и той же ДНК.

**Секвенирование по Сэнгеру.** При секвенировании по Сэнгеру происходит гибридизация синтетического олигонуклеотида. Этот олигонуклеотид является праймером, поставляющим 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза цепи, комплементарной матрице.

Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида. Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается.

В результате этого в каждой из четырех пробирок при участии ДНК-полимеразы образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Далее в пробирки добавляют формамид для расхождения цепей и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырёх дорожках.

Первым методом секвенирования, который учёные сумели применить для обработки целых геномов, стало секвенирование по Сэнгеру. Смысл таков: участок ДНК клонируется, после чего полученная смесь делится на четыре части. Каждая часть помещается в активную среду, где присутствуют:

- (1) ДНК-полимераза, которая, занимается репликацией,
- (2) праймеры, необходимые для начала процесса репликации,
- (3) смесь всех четырёх нуклеотидов, которые будут служить «кирпичиками» для строительства новых копий ДНК,
- (4) и, главное, специальные вариации одного из нуклеотидов (ровно один вид нуклеотидов для каждой части), которые прекращают дальнейшее копирование молекулы ДНК.

Современные секвенаторы – это так называемые секвенаторы второго поколения (SGS, second generation sequencing). В них участки ДНК по-прежнему многократно клонируются, но процесс чтения устроен не так, как у Сэнгера.

**Метод Эдмана.** Суть метода заключается в обработке исследуемого пептида определенным набором реагентов, что приводит к отщеплению одной аминокислоты с N-конца последовательности. Циклическое повторение реакции и анализ продуктов реакций дают информацию о последовательности аминокислот в пептиде.

#### 12.4. Рестрикционный анализ

Данный метод основан на применении ферментов, носящих название рестриктаз. **Рестриктазы** представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК.

В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.

Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера.

Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные фрагменты, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким образом, можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к определенному виду или роду, а также обнаружить участки, подвергнутые мутациям.

Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Комплементационный тест.
- 2) Общие представления о генетическом картировании.
- 3) Первый этап генетического картирования.
- 4) Второй этап генетического картирования.
- 5) Метод цитологических карт.
- 6) Общие представления о секвенировании.
- 7) Секвенирование по Сэнгеру.
- 8) Секвенирование: метод Эдмана.
- 9) Рестрикционный анализ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М. : КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жученко, А.А. Генетика : учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский ; ред. А. А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М. : КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2
3. Коничев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
4. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов С.Н. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

#### *Дополнительная*

1. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
2. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Коничев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Ко-

ничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6

4. Медицинская биология и общая генетика [Электронный ресурс]: учебник / Р.Г. Заяц [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 496 с. – ISBN 978-985-06-2182-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков : учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М. : КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

6. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

7. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

8. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

9. Портал о генетике – <http://eguerrieri.info>

## Лекция 13

### ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ (ТЕХНОЛОГИЯ рДНК)

#### 13.1. Получение фрагментов чужеродной ДНК и их очистка

*Источники ДНК* – геном животных и растительных клеток, плазмиды, вирусы, фаги и др.

*Получить ген можно следующими способами:*

**1.** Разрезание геномной ДНК в определенных местах (сайтах) рестрикционными эндонуклеазами, или рестриктазами (от лат. *restrictio* – ограничение; группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот).

**2.** Искусственный синтез генов. В основе его лежит способность триплета нуклеотидов кодировать синтез определенной аминокислоты. Зная последовательность аминокислот в каком-либо пептиде, можно сконструировать соответствующую последовательность нуклеотидов.

**3.** Использование мРНК. С этой целью из клетки эукариот выделяют мРНК и на ней, как на матрице, при помощи фермента обратной транскриптазы, или ревертазы, инициируют синтез комплементарной копийной ДНК (кДНК). После этого на кДНК синтезируют вторую полинуклеотидную цепь, создавая двуспиральную ДНК.

В любом случае сразу получить готовый ген практически не удается. Необходимо удалять или досинтезировать определенные участки, приспособив ДНК к синтезу нужного продукта.

#### 13.2. Включение фрагмента чужеродной ДНК в векторную плазмиду и получение рДНК

*Для получения рекомбинантных ДНК используют ряд ферментов:*

**1.** *ДНК-полимеразы* – катализируют синтез дочерней нити ДНК на уже существующей матрице ДНК.

**2.** *ДНК-лигазы* – соединяют фрагменты ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами.

**3.** *Нуклеазы* – гидролизуют молекулы нуклеиновых кислот. Экзонуклеазы сокращают ДНК с обоих концов, а эндонуклеазы расщепляют связи внутри молекулы ДНК.

**4.** *РНК-зависимая-ДНК-полимераза (ревертаза)* – катализирует синтез ДНК на мРНК. При этом возникает кДНК. Она служит матрицей для синтеза второй нити ДНК с использованием ДНК-полимеразы или ревертазы.

**5.** *Терминальная трансфераза* – досинтезирует пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды к одной из нитей двойной спирали ДНК.

**6.** *Эндонуклеаза фага* – отщепляет однонитчатые концы с 3'-конца двойной спирали ДНК.

**7.** *Рестрикционные эндонуклеазы, или рестриктазы.* Гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, которые называются сайтами рестрикции. В настоящее время выделено более тысячи микробных рестриктаз. В генетической инженерии используется около 200 рестриктаз.

Фрагменты ДНК, которые получили с помощью рестриктаз, разделяют методом электрофореза в агарозном геле и полиакриламидном геле (ПААГ). Фрагменты ДНК окрашивают, например, бромистым этидием (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид). Для этого их вырезают из геля и экстрагируют фенолом. Затем их концентрируют изобутанолом, переосаждают этанолом и проводят анализ выделенных и очищенных фрагментов. С помощью фрагментов ДНК с известными молекулярными массами определяют молекулярную массу фрагмента. В результате получают рестрикционные карты, т.е. последовательности ДНК с нанесенными на них сайтами разрезания для различных рестриктаз.

Затем проводят **секвенирование** – определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК. Известно два принципа секвенирования: химический и ферментативный сиквенс.

*Химический сиквенс* основан на избирательной химической деградации нуклеотидов. Для этого одноцепочную молекулу ДНК, один конец которой имеет метку ( $^{32}\text{P}$ ) разделяют на четыре части и каждую из них обрабатывают реагентом, разрушающим одно или два из четырех оснований. Так, 60% муравьиная кислота разрушает пуриновые основания (А+Г), диметилсульфат – гуанидиновые основания, чистый гидразин – пиримидиновые основания (Т+Ц), 1,5 М NaCl – цитозиновые основания. Если поврежденные молекулы обработать пиперидином, то в ДНК образуется разрыв в том месте, где находились разрушенные основания. С помощью электролиза и радиоавтографии ( $^{32}\text{P}$ ) определяют положение разрушенного основания, а затем и нуклеотидную последовательность в фрагментах ДНК.

*Ферментативный сиквенс*, или секвенирование путем терминации (остановки синтеза) цепи. Терминирующими агентами являются 2',3'-дидезокситрифосфаты (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддУТФ), которые не могут образовывать фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеотидом. В результате элонгация цепи прекращается там, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид. Полученные фрагменты разделяют в ПААГ, проводят радиоавтографию и по распределению фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК.

С помощью этих методов расшифрованы нуклеотидные последовательности нескольких тысяч генов про- и эукариот. Так, секвенированы геномы дрожжей, дрожефилов, человека и др. Полученные результаты заносятся в базы данных (банки генов).

### 13.3. Введение рДНК в компетентные клетки и клонирование генов

Для того, чтобы полученный ген реализовал хранимую в нем информацию, его нужно ввести в геном клетки-хозяина. Перенос генов осуществляют векторы.

**Векторы** – это кольцевые молекулы, которые способны к самостоятельной репликации. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК. Векторами могут быть плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы.

#### Типы векторов:

- *векторы для клонирования* – они позволяют амплифицировать (увеличение копий ДНК) фрагмент ДНК, встроенного в вектор, посредством репликации. Наиболее часто используются плазмиды и фаги. Для клонирования больших фрагментов в качестве векторов используют искусственные бактериальные и дрожжевые хромосомы;

- *экспрессионные векторы* – используются для анализа конкретных

последовательностей генов и их белковых продуцентов, а также в наработке конкретного белка;

- *векторы для трансформации* – используются для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента.

#### **Требования, предъявляемые к векторам:**

- легко накапливаться и выделяться в достаточном количестве;
- содержать генетические маркеры для отбора последующих трансформантов;
- иметь несколько сайтов узнавания различными рестриктазами для получения при клонировании разных молекул ДНК;
- не аборттировать встроенный фрагмент;
- реплицироваться в определенных клетках за счет имеющейся последовательности точки начала репликации.

#### **Общая схема конструирования рДНК**

Конструирование осуществляется *in vitro*. Кольцевая молекула вектора разрезается рестриктазой. Полученная линейная молекула ДНК должна содержать липкие концы, комплементарные концам вводимой ДНК. Эти концы вектора и концы вводимого гена сшивают ДНК-лигазой. Этот же фермент замыкает линейную молекулу ДНК в единую кольцевую структуру.

Введение рДНК в клетку осуществляют следующими способами:

1. *Трансдукция* – если рекомбинантные векторы упакованы в инфекционной фаговой частице, то их можно вводить в бактериальную клетку путем естественного проникновения фага в клетку.
2. *Трансформация* – введение в клетку фрагментов нативной ДНК.
3. *Трансфекция* – введение голей фаговой ДНК.

Клетки должны быть компетентными к вводимой рДНК. Это достигается обработкой клетки хлористым кальцием, тепловым ударом или лизоцимом. Эффективность трансформации увеличивают диэтиламиноэтилдекстран и полиэтиленгликоль. Дрожжи становятся компетентными под влиянием литиевых солей и электроимпульсов. В клетки высших организмов ДНК вводят микроинъекцией.

Обычно частота трансформации невысока – одна клетка на несколько тысяч или десятков тысяч клеток. Кроме того, не все клетки содержат клонируемый ген.

Так, сконструированы векторы для прямого отбора рекомбинантных трансформированных клеток. Эти векторы содержат летальный ген для реципиентной, но нетрансформированной клетки. В такой ситуации колонии способны образовывать только те клетки, в которых находятся клонируемые гены. Нуклеотидные последовательности таких клеток можно идентифицировать с помощью специфических полинуклеотидных зондов, меченых радиоактивными изотопами.

Трансформированные с экспрессирующим вектором клоны можно отбирать также по продукту введенного гена. Так, внесение генов амилаз в клетки, не растущие на крахмале, обеспечивают рост на этом субстрате только тех клеток, которые были подвергнуты трансформации.

Важным этапом клонирования генов является *сохранение рекомбинантных ДНК*.

В клетках, например, в *E. coli*, всегда присутствуют эндонуклеазы, которые расщепляют введенные молекулы рДНК. Для предотвращения этого используют

мутантные клетки *E. coli*, на которые эндонуклеазы не действуют.

Часто продукты, которые синтезированы по информации введенных генов, разрушаются протеазами. Поэтому используют мутанты со сниженной активностью протеаз.

Меньше разрушаются длинные полипептидные молекулы. Так, к вектору  $\beta$ -галактозидазы присоединяют ген какого-либо полипептида, который удаляют после синтеза нужного продукта.

### 13.4. Амплификация

**Амплификация** (от англ. *amplification* – увеличение) – это образование дополнительных копий хромосомных последовательностей. Благодаря этому можно повысить эффективность биообъектов, используемых в производстве. Множественные копии определенных фрагментов ДНК получают *in vitro* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР является высоко чувствительной и специфичной, она позволяет обнаружить и исследовать даже единичную копию гена.

*Для ПЦР необходимо:*

- два синтетических олигонуклеотидных праймера (короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, который служит стартовой точкой при репликации ДНК) длиной ~20 нуклеотидов;
- ДНК-мишень;
- термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет активность при температуре 95°C и выше;
- четыре дезоксирибонуклеотида.

*ПЦР-амплификация – это многократное повторение трех реакций:*

1. Денатурация – образец ДНК выдерживают при температуре 95°C в течение 1 минуты. В среде должны находиться 2 праймера, ДНК-полимераза, 4 дезоксирибонуклеотида.
2. Ренатурация. Температуру смеси медленно понижают до 55°C, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.
3. Синтез. Температуру смеси повышают до 75°C, при этом начинается полуконсервативный синтез комплементарной цепи ДНК. Каждый из этих циклов длится 3-5 минут.

Полученные новые нити ДНК являются шаблонами (матрицами) для других праймеров. Это вызывает экспоненциальное увеличение нужных участков ДНК. Процесс носит цепной характер. ПЦР применяют для идентификации патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений, спонтанных мутаций, а также сборки генов.

### 13.5. Экспрессия рДНК

**Экспрессия генов** – проявление функциональная активность генов во время транскрипции и трансляции. Так были получены и внедрены в производство штаммы бактерий и дрожжей, которые способны продуцировать инсулин, соматотропин, интерферон, интерлейкины и другие биологически активные вещества. Созданы

растения с повышенной кормовой и питательной ценностью, более значительным фотосинтезом и азотфиксацией, устойчивые к различным фитопатогенам. Большую перспективу открывает технология трансгенных животных. Создано стадо овец с геном человека, который контролирует выработку факторов свертываемости крови, используемых для лечения людей. Сконструированы бактерии, которые очищают каменный уголь от серы и превращают его в жидкое и газообразное топливо.

*Технологическая схема клонирования и экспрессии генов следующая:*

1. сортинг хромосом и получение ДНК;
2. введение ДНК в вектор;
3. трансформация, трансфекция, трансдукция и др.;
4. обнаружение и накопление клона клеток;
5. выделение рДНК (плазмиды);
6. определение нуклеотидной последовательности в клонированном фрагменте ДНК;
7. конструирование и построение плазмиды для экспрессии ее функций;
8. обнаружение и накопление клона;
9. выделение плазмиды и проверка нуклеотидной последовательности в рДНК;
10. трансформация;
11. выращивание культуры для получения экспрессируемого белка;
12. выделение белка.

### **Вопросы для самоконтроля**

- 1) Источники ДНК.
- 2) Способы получения гена.
- 3) Ферменты для получения рекомбинантных ДНК.
- 4) Химический сиквенс.
- 5) Ферментативный сиквенс.
- 6) Векторы, типы векторов.
- 7) Требования, предъявляемые к векторам.
- 8) Общая схема конструирования рДНК.
- 9) Способы введения рДНК в клетку.
- 10) Сохранение рекомбинантных ДНК.
- 11) Амплификация.
- 12) ПЦР.
- 13) Экспрессия генов.
- 14) Технологическая схема клонирования и экспрессии генов.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

#### *Основная литература*

1. Цымбаленко, Н.В. Биотехнология. Часть 1. Технология рекомбинантной ДНК [Электронный ресурс]: учебное пособие; доп. УМО / Н.В. Цымбаленко. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2011. – 127 с. // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов С.Н. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

*Дополнительная*

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
4. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
5. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

## Лекция 14

### ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

#### 14.1. Источники ферментов

Ферменты и ферментные системы применяются в медицине, сельском хозяйстве, органическом синтезе, химическом анализе, в различных отраслях промышленности (пищевая, фармацевтическая, текстильная, кожевенная и др.). Ферменты получают из растительных и животных тканей или путем микробного синтеза.

*Ферменты животного происхождения:*

- лактатдегидрогеназа – сердце крупного рогатого скота;
- каталаза – печень КРС, свиньи;
- сычужный фермент – сычуг молочных телят и ягнят;
- щелочная фосфатаза – кишечник КРС;
- гиалуронидаза – семенники КРС;
- фумараза, трансаминаза – сердце свиньи;
- трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, эластаза – поджелудочная железа свиньи;
- пепсин – желудок свиньи;
- люцифераза – мышечная ткань светлячков;
- ацетилхолинэстераза – мышечная ткань электрического угря.

*Ферменты растительного происхождения:*

- амилазы – ячмень;
- протеазы (папаин – дынное дерево; фицин – фиговое дерево; бромелин – ананас);
- кислая фосфатаза – картофель;
- пероксидаза – хрен;
- уреазы – канавалия мечевидная.

Получение ферментов из растительного и животного сырья имеет ряд недостатков. Так, для растений характерна сезонность, а содержание ферментов в них низкое. Выделение ферментов из животного сырья следует извлекать сразу на мясокомбинатах или возникает проблема его консервации и хранения.

Менее проблематично получение ферментов микробным синтезом. Методами генетической инженерии можно не только целенаправленно увеличить выход фермента, но и получить биообъект, который продуцирует ферменты с улучшенными свойствами (термостабильные, осмоустойчивые, кислото- и щелочустойчивые и др.). Многие микроорганизмы выделяют ферменты в питательную среду, это облегчает их выделение. В настоящее время налажено крупномасштабное микробиологическое производство следующих ферментов путем (протеаза,  $\alpha$ -амилаза, глюкоамилаза, глюкоизомераза и пектиназа).

Однако применение нативных ферментов ограничено по следующим причинам:

1. неустойчивость при хранении и различных воздействиях;
2. сложность их отделения от реагентов и продуктов реакции.

## 14.2. Преимущества иммобилизованных ферментов

Более перспективно использование *иммобилизованных ферментов* (от лат. *immobilis* – неподвижный). Это ферменты, адсорбированные различными физико-химическими методами на твердых носителях или связанные с ними химическими связями. Так, в 1916 г. Нельсон и Гриффин показали, что адсорбированная на угле инвертаза сохраняет каталитическую активность. В 1939 г. был получен первый патент на применение адсорбированных на опилках протеолитических ферментов для обработки шкур. Термин «иммобилизованный фермент» узаконен в 1971 г.

### *Особенности и преимущества иммобилизованных ферментов:*

1. Фермент легко отделить от реакционной среды. Это позволяет остановить реакцию в нужный момент; использовать катализатор повторно; получить продукт не загрязненный ферментом;
2. Процесс можно проводить непрерывно. При этом можно регулировать скорость катализируемой реакции и выход целевого продукта;
3. Путем иммобилизации можно направленно изменить свойства катализатора (специфичность, зависимость от pH и ионного состава среды, действия денатурирующих агентов);
4. Путем иммобилизации можно регулировать каталитическую активность ферментов (путем изменения свойств носителя).

*Кинетика ферментативных реакций с использованием иммобилизованных ферментов зависит от:* концентрации субстрата; температуры; концентрации иммобилизованного фермента; степени измельчения частиц с иммобилизованным ферментом; скорости перемешивания; ингибирующего или активирующего действия полимерного носителя; pH и т.д.

Иммобилизованные ферменты и клетки применяются для производства глюкозо-фруктозных сиропов, L-аминокислот, L-яблочной кислоты, безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки, 6-аминопенициллановой кислоты и др.

Технология применения иммобилизованных ферментов и биокаталитических систем экономически эффективна. Так, получение фруктозы из глюкозы с применением иммобилизованной глюкоизомеразы стало дешевле почти вдвое.

## 14.3. Характеристика носителей для иммобилизации ферментов

### *Требования, предъявляемые к носителям:*

1. Высокая химическая и биологическая стойкость, механическая прочность и гидрофильность;
2. Достаточная проницаемость для ферментов и субстратов, большая удельная поверхность, высокая вместимость и пористость;
3. Должны иметь удобные технологические формы (гранулы, мембраны, трубы, листья, волокна и др.);
4. Должны легко переводиться в реакционно-способную форму;
5. Низкая стоимость.

Носители могут быть органическими и неорганическими.

## Органические носители

### 1) Природные полимерные носители

#### • Полисахаридные носители

– целлюлоза – обладает хорошей гидрофильностью, содержит много гидроксильных групп, легко гранулируется, но неустойчива к действию сильных кислот, щелочей и окислителей;

– декстран – разветвленный полисахарид бактерий, состоит из остатков глюкозы. Гели на основе декстрана, сшитые эпихлоргидрином, выпускаются в Швеции под названием сефадекс, а в Венгрии – молселект. При высушивании сефадексы легко сжимаются, а в водных растворах сильно набухают;

– агароза и ее модификации (сефароза, биогель А);

– хитин, крахмал и губчатый крахмал, агар, каррагинан, альгиновые кислоты и их соли, гепарин и др.

• *Белковые носители* – кератин, фиброин, коллаген, миозин, сывороточный альбумин, желатин.

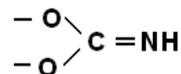
• *Липидные носители* – применяются в виде монослоев или бислоев. Монослой сорбируют белковые молекулы. Липидный монослой может на твердую подложку (силикагель, сажу, аэросил – коллоидный SiO<sub>2</sub>) с последующей сорбцией белка из водного раствора. Для иммобилизации используют также липосомы, получаемые из различных фосфолипидов. К синтетическим аналогам липидов относятся поверхностно-активные вещества (ПАВ). При этом полярные головки ПАВ образуют ядро мицеллы, куда можно включить любое гидрофильное вещество, а углеводородные остатки этих молекул направлены в сторону органического растворителя.

### 2) Синтетические полимерные носители

– полимеры на основе стирола (дауэкс и амберлит). Они подобны стеклам, имеют стабильную структуру пор, не набухают в воде, обладают высокой механической прочностью;

– носители на основе производных акриловой кислоты (акриламид). Клетки различного типа успешно иммобилизуются в полиакриламидном геле (ПААГ).

Функциональные группы полимерных носителей следует либо активировать, либо вводить дополнительные заместители. Так, при активации гидроксильных или аминогрупп на поверхности носителя образуют электрофильные группы, которые обладают высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным группам на белке (ферменте). Например, амидокарбонаты:



Различными способами в носитель вводят аминогруппы.

**Неорганические носители** – силикагель, глины, керамика, природные минералы, графитированная сажа, металлы и их оксиды. Их применяют в виде шариков, монолитов, порошка. Они могут быть пористыми и без пор. Преимущества: легкость регенерации; возможность придания любой конфигурации. Для активации их покрывают пленкой оксида металла (алюминия, циркония, титана), полимерами (полиэтиленмин) или обрабатывают солями переходных металлов.

#### 14.4. Физическая иммобилизация ферментов

При этом фермент включают в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата.

##### Методы физической иммобилизации

**1. Иммобилизация путем адсорбции на нерастворимых носителях** – основана на удержании фермента на носителе за счет ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий, электростатических сил и водородных связей между носителем и поверхностными группами белка. После отмывки неадсорбированного фермента препарат можно использовать. Метод применяется для иммобилизации каталазы, пепсина, аспарагиназы и др.

*На адсорбцию фермента влияют следующие факторы:* удельная поверхность и пористость носителя; рН, ионная сила и концентрация раствора фермента; температура.

*Приемы:*

1. Статический – носитель и водный раствор фермента смешивают и оставляют на сутки или более. Иммобилизация достигается за счет самопроизвольной диффузии фермента к носителю с последующей его адсорбцией.

2. Перемешивание раствора фермента и носителя с помощью магнитной мешалки.

3. Электроосаждение – в раствор фермента погружают два электрода, на один из которых нанесен носитель, и пропускают электрический ток.

4. Метод нанесения в колонке – через колонку с носителем прокачивают раствор фермента.

Для повышения эффективности адсорбции носитель и фермент предварительно модифицируют. Так, носитель выдерживают в буферном растворе или обрабатывают, например, веществами, молекулы которых содержат большое число функциональных групп (альбумин). Ферменты обрабатывают соединениями, содержащими ионогенные группы (поликислоты, карбоксиметилцеллюлоза и др.). Для дополнительного удержания фермента на носителе используют электроудержание.

*Преимущества метода* – доступность и дешевизна сорбентов, простота методики.  
*Недостатки метода* – фермент удерживается на носителе недостаточно прочно.

**2. Иммобилизация путем включения в поры геля** – молекулы фермента включают в трехмерную сетку из тесно переплетенных цепей, образующих гель. На активность ферментов влияет содержание фермента, размеры гелевых частиц и природа полимерной матрицы.

Гели образуют из крахмала, агар-агара, каррагинана или агарозы. Сшитые гели можно получить, например, при воздействии на водные растворы поливинилового спирта гамма-излучением или потоком электронов. Используют включение ферментов в матрицу из фотополимеризующихся смол. Они содержат fotocувствительные функциональные группы и при действии ультрафиолетового облучения образуют между собой ковалентные связи и трехмерную сетку.

Для получения неорганических гелей используют поликремниевую кислоту (силикагель) или фосфат кальция.

Метод применяется для иммобилизации лактатдегидрогеназы, пероксидазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз, трипсина и др.

*Способы:*

1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию. В реакционную смесь добавляют сшивающие агенты, которые придают полимеру структуру трехмерной сетки. Таким путем иммобилизуют трипсин, рибонуклеазу и  $\beta$ -амилазу.

2. Фермент помещают в раствор уже готового полимера, который затем переводят в гелеобразное состояние.

*Преимущества метода:*

- простота методики;
- возможность создания иммобилизованных препаратов любой геометрической конфигурации (сферические частицы, пленки);
- высокая химическая, механическая и тепловая стойкость;
- неоднократность использования;
- универсальность – метод применим для иммобилизации практически любых ферментов, а также полиферментных систем, клеточных фрагментов и целых клеток;
- ферменты защищены от бактериального загрязнения.

*Недостатки метода:*

- полимерная матрица создает препятствия для диффузии субстрата к ферменту. Это снижает его каталитическую активность;
- если субстратом является ВМС, то метод не применим.

### **3. Иммобилизация путем отделения фермента от остальной среды полупроницаемой перегородкой (мембраной)**

*Способы:*

- Микрокапсулирование. Изготавливаются микрокапсулы размером от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров, толщина мембран – составляет десятые-сотые доли мкм, диаметр пор – несколько нм. Внутри этих микрокапсул находятся ферменты, например, аспарагиназа.

- Двойное эмульгирование. Получают эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе полимера. Ее вновь диспергируют, но в воде. В результате получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, которые содержат еще более мелкие включенные капли водного раствора фермента. Через некоторое время органический раствор затвердевает, и образуются полимерные сферические частицы с включенным в них ферментом.

- Включение в волокна. Водный раствор фермента в органическом растворе волокнообразующего полимера (целлюлоза, поливинилхлорид и др.) продавливают через фильтры в жидкость (толуол), которая вызывает коагуляцию полимера. Так, например, изготавливают хирургические салфетки с иммобилизованным трипсином.

- Включение в липосомы. Ферменты, иммобилизованные этим методом, применяются, главным образом, в медицинских целях, а также для проведения фундаментальных исследований, ибо липосомы по своей природе близки природным биомембранам.

*Преимущества метода* – простота и универсальность, высокое содержание включенного фермента, сохранение его каталитической активности. *Недостатки метода* – затруднено ферментативное превращение ВМС.

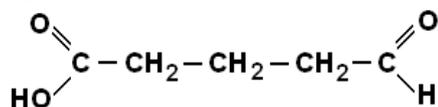
### **4. Иммобилизация путем включения в двухфазную реакционную среду – при этом**

субстрат под действием фермента перерабатывается в водной фазе, а продукт экстрагируется в фазу органического растворителя. Так можно гидролизовать крахмал под действием смеси  $\alpha$ -амилазы и амилаглюкозидазы в двухфазной системе из водных растворов крахмала и полиэтиленгликоля. *Недостатки метода* – низкая скорость процесса, инактивация фермента при его адсорбции на границе раздела фаз, загрязнение продукта и др.

#### 14.5. Химическая иммобилизация ферментов

При этом путем химического воздействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи (между белком и носителем). Ковалентная связь обеспечивает высокую прочность конъюгата. При этом существенно изменяется субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность фермента.

При химической иммобилизации фермент отдален от носителя благодаря «ножке». Для этого применяют сшивающие агенты различной длины, чаще всего это глутаровый альдегид:

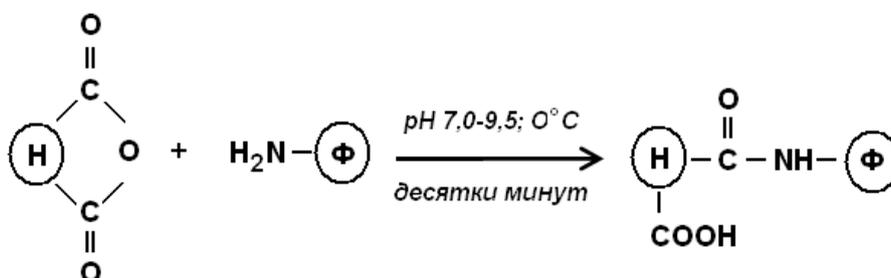


В процессе ковалентной иммобилизации должны участвовать только те группы молекулы фермента, которые несущественны для его функции. Эти группы должны быть высокореакционноспособными. Наиболее реакционноспособными группами в белках являются SH-группы цистеина. Они участвуют в реакциях окисления, ацилирования, алкилирования и т.д. Однако в белках свободных SH-групп недостаточно, так как они участвуют в образовании дисульфидных мостиков или необходимы для каталитической активности фермента. Поэтому используют аминокетильные группы. Они достаточно реакционноспособны, обычно играют второстепенную роль в поддержании структуры и функции ферментов. Используют также имидазольные, гуанидиновые и гидроксильные группы.

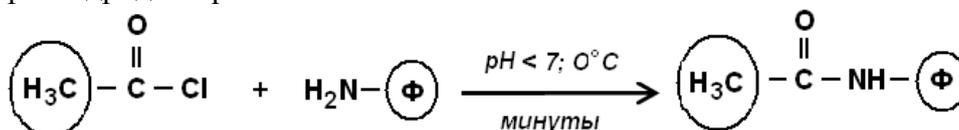
#### Приёмы химической иммобилизации:

**1. Реакция образования амидной связи.** Часто применяют реакцию ацилирования аминокетильных групп фермента, используя:

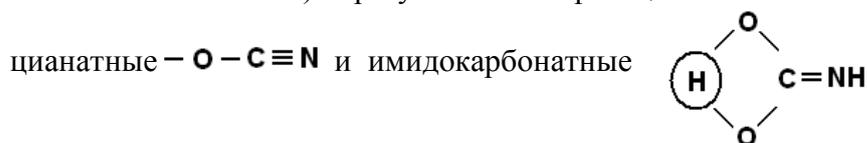
а) ангидриды карбоновых кислот:



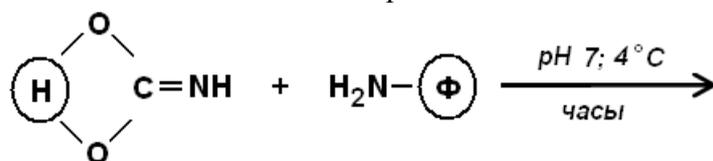
б) хлорангидриды карбоновых кислот:



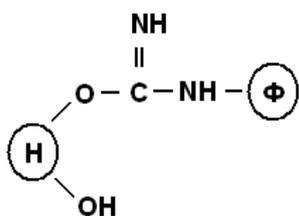
**2. Реакция образования карбамидных связей.** Для этого часто используют бромциановый метод. При обработке бромцианом на природных носителях (или синтетических полиолах) образуются очень реакционноспособные группы:



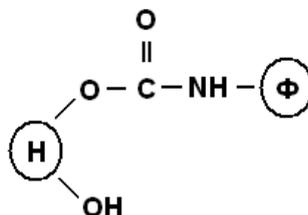
При взаимодействии белка с таким активированным носителем образуются:



а) изомочевины

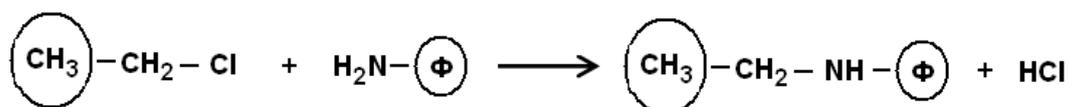


б) уретаны

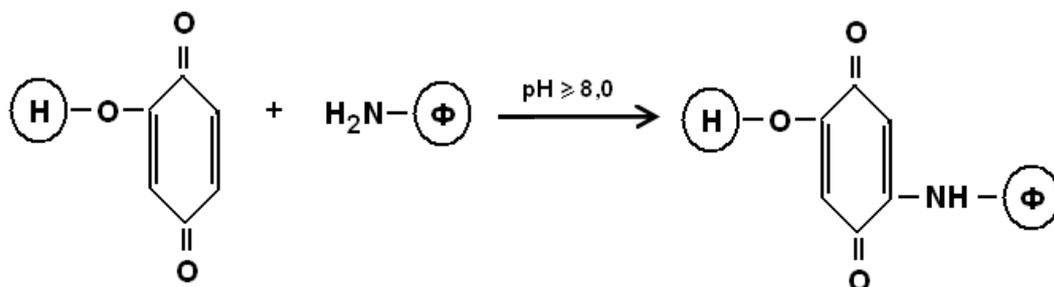


Бромциановым методом иммобилизуют аспарагиназу, ацетилхолинэстеразу, холинэстеразу.

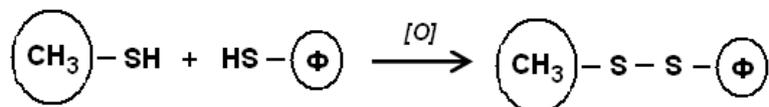
**3. Реакции образования вторичных аминов** –  $\alpha$ - и  $\varepsilon$ -аминогруппы белков можно трансформировать во вторичные в реакциях алкилирования и арилирования, а также путем восстановления азометиновых связей (оснований Шиффа). Алкилирующими и арилирующими агентами служат галогенпроизводные алифатических и ароматических углеводов, а также метилалканов:



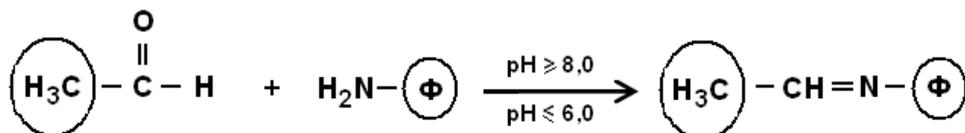
В таких условиях алкилируются тиольные, имидазольные и гидроксильные группы. Окислительное арилирование осуществляют с помощью бензохинона:



4. **Реакции тиол-дисульфидного обмена** – основаны на формировании межмолекулярных дисульфидных связей боргидридом натрия, меркаптоэтанолом, цистеином и др.:



5. **Модификация аминогрупп с образованием азометиновых связей – CH=N–** в реакциях белков с альдегидами. Такие связи легко разрушаются в кислых средах с регенерацией исходных веществ:



#### 14.5. Сохранение стабильности иммобилизованных ферментов

Для иммобилизованных ферментов число возможных инактивационных механизмов значительно меньше, чем для нативных ферментов. Так, иммобилизация подавляет агрегацию и автолиз, сорбцию на стенках реактора, нивелирует действие протеаз, фосфорилаз и фосфатаз. Носитель механически защищает молекулы ферментов от деформаций в потоке.

Инактивация ферментов может быть физической и химической. Молекулярные механизмы инактивации ферментов можно представить в виде двух стадий:



где *N* – нативная форма белка; *D* – обратимо денатурированная форма белка; *I* – необратимо инактивированная форма белка.

Стадия ( $N \rightleftharpoons D$ ) – это чаще всего обратимое конформационное изменение.

На стадии ( $D \rightarrow I$ ) инактивация ферментов усиливается при длительной инкубации, высокой температуре, экстремальных значениях pH, в присутствии химических денатуратов и т.д.

Инактивация ферментов сопровождается изменением первичной структуры за счет разрыва полипептидной цепи или химической модификации отдельных функциональных групп. Возможна рацемизация аминокислот, дезаминирование аспарагина, десорбция кофакторов из активного центра, сорбция белка на стенках реактора, инактивация в потоке и др.

#### 14.6. Иммобилизация клеток и органелл

Наиболее целесообразно подвергать иммобилизации покоящиеся клетки. Иммобилизация способствует повышению проницаемости клеточной стенки. Одновременно проводят мероприятия, направленные на повышение проницаемости клеточной стенки (обработка клеток органическими растворителями, изменение pH, введение фитогормонов и др., удаление клеточной стенки). При этом клетки выделяют в культуральную жидкость максимальное количество целевого продукта и не

накапливают его внутриклеточно.

Изолированные клеточные органеллы (хлоропласты, митохондрии, микросомы, лизосомы, пероксисомы и др.) не растут и не делятся. Они содержат ферменты и в то же время свободны от других компонентов клетки.

*Преимущества иммобилизации клеток и органелл* – сохранение природного микроокружения, что обеспечивает ферментам повышенную стабильность, воспроизведение ферментов природным путем и др. *Недостатка метода* – недостаточно разработана кинетика иммобилизованных клеток.

#### 14.7. Соиммобилизация

Вариантом иммобилизации является **соиммобилизация** – совместная иммобилизация различных биокатализаторов (двух или более ферментов, видов клеток, комбинаций ферментов и клеток и т.д.). Соиммобилизация позволяет осуществлять многостадийные процессы *in vitro*. Важно учитывать функциональную совместимость биокаталитических систем. Например, превращение крахмала во фруктозу с применением соиммобилизованных глюкоамилазы и бактериальных клеток с глюкоизомеразной активностью не удастся. Это объясняется несовпадением оптимумов рН для двух биокатализаторов.

#### Вопросы для самоконтроля

- 1) Источники ферментов.
- 2) Ограничения по применению нативных ферментов.
- 3) Особенности и преимущества иммобилизованных ферментов.
- 4) Требования, предъявляемые к носителям для иммобилизованных ферментов.
- 5) Органические носители.
- 6) Неорганические носители.
- 7) Методы физической иммобилизации.
- 8) Методы химической иммобилизации ферментов.
- 9) Сохранение стабильности иммобилизованных ферментов.
- 10) Иммобилизация клеток и органелл.
- 11) Соиммобилизация.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

##### *Основная литература*

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
3. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

##### *Дополнительная*

1. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## Лекция 15

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

#### 15.1. Строение, свойства и функции биомембран

Биологическая мембрана – это структура, состоящая из органических молекул, которая имеет толщину около 7-10 нм и видима только посредством электронного микроскопа. В каждой клетке есть плазматическая мембрана, которая ограничивает содержимое клетки от наружной среды, и внутренние мембраны, которые формируют различные органоиды клетки (митохондрии, органоиды, лизосомы и т.п.).

##### **Функции биомембран:**

- 1) Образуют избирательный барьер, который отделяет содержимое клетки от окружающей среды, что позволяет поддерживать постоянными химический состав цитоплазмы и её физические свойства.
- 2) Регулируют транспорт веществ между содержимым клетки и окружающим клетку раствором.
- 3) Принимают участие в информационных процессах в живой клетке.

##### **Химическая состав и структура плазматической мембраны:**

В состав плазматической мембраны входят липиды, белки и углеводы. Соотношение между липидами и белками может значительно варьировать в различных клетках.

Липиды мембраны бывают трех видов: глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды и стероиды (холестерол).

Молекула *глицерофосфолипида* состоит из остатка трёхатомного спирта глицерола, атомы водорода двух гидроксильных групп которого замещены на две длинные цепи жирных кислот. Третий атом водорода гидроксильной группы глицерина замещён остатком фосфорной кислоты, к которому, в свою очередь, присоединён остаток одного из азотистых оснований (холин, этаноламин, серин, инозитол).

В молекуле глицерофосфолипида можно выделить две части, которые называются головка (остаток глицерина, остаток фосфорной кислоты и азотистое основание) и хвосты (остатки жирных кислот). Головка и хвосты сильно отличаются по своим физическим свойствам. Головка молекулы фосфолипида гидрофильна ("любит воду"). Она хорошо растворима в воде. Хвосты – гидрофобны ("боятся воды"). Они легко растворяются в липидах и органических растворителях, но водой отталкиваются. Таким образом, в целом молекула фосфолипида, содержащая как водорастворимые, так и липидорастворимые области, имеет амфифильные свойства.

Молекулы *сфингофосфолипидов* также состоят из головки и хвостиков. Они отличаются из фосфолипидов тем, что вместо остатка глицерина содержат остаток спирта сфингозина.

Если сухие фосфолипиды погружают в воду, они спонтанно формируют в зависимости от их концентрации различные структуры (Рис. 15.1). Одна из них – сферическая структура, называемая мицеллой. Молекулы фосфолипидов упорядочены так, что гидрофильные головки направлены в водную среду, а гидрофобные хвосты – внутрь структуры.

При более высокой концентрации фосфолипидов, их молекулы формируют бислойные пластинчатые структуры. Немецкие ученые Gorter и Grendel доказали, что такая

бислойная фосфолипидная структура является основой мембраны клетки.

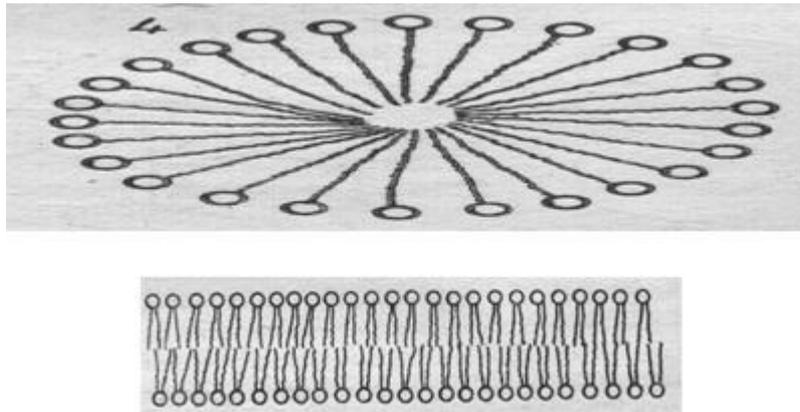


Рис. 15.1. Мицелла и бислойная пластина в водном растворе

Физическое состояние фосфолипидного бислоя зависит от температуры. Если температура превышает критическую точку, бислой представляет собой жидкость. При этом каждая молекула имеют возможность перемещаться.

Существует несколько видов движения молекул липидов: колебание, вращение, латеральная диффузия (перемещение молекул в пределах своего слоя), флип-флоп (перемещение молекул из одного слоя липидов в другой, происходит редко).

Если температура падает ниже критической точки, мембранные фосфолипиды становятся твердыми. Мембрана теряет текучесть, и движение молекул в ней ограничивается.

Согласно современной *жидкостно-мозаичной модели мембраны* (модель Сингера и Николсона), липидный бислой является основой мембраны. Молекулы фосфолипидов расположены в нём так, что их длинные оси параллельны и ориентированы перпендикулярно к поверхности мембраны. Мембрана сохраняется в жидком состоянии благодаря температуре клетки и химическому составу жирных кислот.

Белки мембраны подразделены на два вида. Молекулы первого типа являются гидрофильными. Эти белки, называемые периферическими, соединены с поверхностью мембраны сравнительно слабыми электростатическими силами. Белки второго вида имеют как гидрофильные, так и гидрофобные группы. Их молекулы более или менее погружены в мембрану, и удерживаются в ней более прочными гидрофобными силами. Некоторые белки пронизывают мембрану от её внутренней до внешней поверхностей – интегральные белки (Рис. 15.2).

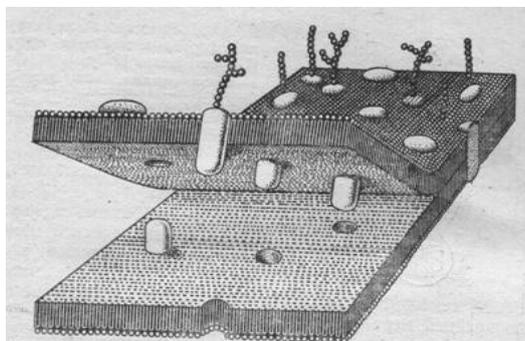


Рис. 15.2. Жидкостно-мозаичная модель мембраны: фосфолипидный бислой; периферические и интегральные белки

Многочисленные белки мембраны выполняют *различные функции* (метаболическую, транспортную, рецепторную и т.п.). Функции белков мембраны существенно зависят от строения их молекул.

## 15.2. Механизмы мембранного транспорта

Мембрана клетки является избирательным барьером для различных веществ, находящихся внутри и снаружи клетки. Существует несколько специфических механизмов транспорта в мембранах. Все они могут быть подразделены на два типа: **пассивный и активный транспорт**.

Все виды **пассивного транспорта** основаны на принципе диффузии. Небольшая частица, растворённая в жидкости, постоянно подвергается ударам со стороны окружающих её молекул жидкости. Результатом этого является хаотическое движение частицы, которое называется броуновским движением. Диффузия является результатом хаотических независимых движений многих частиц. Если концентрация вещества одинаковая в каждой части раствора, то движение частиц хаотично. При этом существует дрейф частиц из областей, где они расположены более плотно, в области, где частиц меньше.

Диффузия незаряженных частиц вызывается их *концентрационным градиентом* и направлена в сторону уменьшения этого градиента. Частицы вещества перемещаются из области более высокой концентрации вещества в области, где концентрация этого вещества низкая. Диффузия постепенно уменьшает градиент концентрации до тех пор, пока не наступит состояние равновесия. При этом в каждой точке установится равная концентрация, и диффузия в обоих направлениях будет осуществляться в равной степени. Диффузия является пассивным транспортом, поскольку не требует затрат внешней энергии.

Существует несколько видов диффузии в плазматической мембране:

- 1) Свободная диффузия.
- 2) Облегченная диффузия неэлектролитов.
- 3) Электродиффузия (облегченная диффузия ионов).

Раствор вещества высокой концентрации обладает более высокой свободной энергией, чем раствор вещества более низкой концентрации. В процессе диффузии энергия рассеивается. Напротив, вещество не может переместиться из области низкой его концентрации в область высокой его концентрации за счёт внутренней энергии. Для этого необходима дополнительная энергия из внешнего источника.

Для того, чтобы перемещать вещества против их концентрационного или электрохимического градиентов, мембрана использует энергию метаболизма. Такой тип транспорта называется **активным транспортом**. Есть два основных вида активного транспорта:

- 1) Первично-активный транспорт.
- 2) Вторично-активный транспорт.

Более сложные механизмы транспорта – **экзоцитоз** и **эндоцитоз**, в ходе которых макромолекулы поступают в клетку или выделяются из неё через небольшие, окружённые мембраной везикулы.

Проницаемость мембраны для неэлектролитов существенно зависит от их способности растворяться в билипидном слое мембраны. Проницаемость мембраны для различных веществ определяют по растворимости в оливковом масле, которую можно рассматривать как модель мембранных липидов. Таким образом, мембрана хорошо

проницаема для липидорастворимых веществ (спирты, эфиры), не имеющих биологического значения. Но такие гидрофильные вещества как сахара, аминокислоты не способны проникать через биологическую мембрану посредством свободной диффузии. Для этого требуются специальные системы транспорта.

Проницаемость мембраны зависит также от размера молекул. Мелкие молекулы могут проникать через мембрану путём свободной диффузии. Например, вода не растворима в липидах и органических растворителях. Но она проникает через плазматическую мембрану благодаря небольшому размеру молекул. Проницаемость мембраны для воды очень высокая. Предполагают, что она проникает в мембрану через временные структурные дефекты, формирующихся при тепловых колебаниях хвостиков из жирных кислот. Эти дефекты (кинки) позволяют перемещаться через мембрану не только молекулам воды, но также другим небольшим гидрофильным молекулам (кислород, углекислый газ).

**Облегченная диффузия.** Крупные гидрофильные молекулы (сахара, аминокислоты) перемещаются через мембраны с помощью специальных молекул – мембранных переносчиков. Мембранные переносчики представляют собой интегральные белки, которые имеют центры связывания транспортируемых молекул. Образующаяся связь белка и переносчика является обратимой и обладает высокой степенью специфичности. Транспортируемая молекула проходит через мембрану вследствие изменения конформации белка-переносчика при химическом взаимодействии центров связывания обеих молекул.

Транспорт веществ через мембрану, в котором используются транспортные молекулы, называются облегчённой диффузией. Этот тип транспорта мембраны является одним из видов диффузии, поскольку транспортируемое вещество перемещается по градиенту концентрации. Никакая дополнительная энергия не требуется для этого процесса. Но облегченная диффузия отличается от свободной диффузии своей высокой специфичностью. Переносчики мембраны могут узнавать даже оптические изомеры одного и того же вещества.

Другой особенностью облегченной диффузии является феномен насыщения. Поток вещества, транспортируемого путём облегченной диффузии, растёт в зависимости от концентрации вещества только до определенной величины. Затем возрастание потока прекращается, поскольку транспортная система полностью занята. Таким образом, действие транспортной системы подобно катализу ферментами, однако переносчик не ускоряет химическую реакцию, а перемещает вещество через мембрану.

Существуют некоторые системы переносчиков, которые способны транспортировать более одного вещества. Процесс называется *симпортом* (или котранспортом), если вещества перемещаются в одном и том же направлении, и *антипортом* (встречным транспортом), если направления перемещения веществ противоположны.

Примером облегченной диффузии является действие системы транспорта глюкозы через мембраны эритроцитов и мышечных клеток. Другой пример – антипорт бикарбоната и ионов гидроксила в плазматической мембране эритроцитов.

*Электродиффузия* – диффузия электрически заряженных частиц (ионов) под влиянием концентрационных и электрических градиентов. Липидный бислой мембраны непроницаем для ионов. Они могут проникнуть через плазматическую мембрану только посредством специальных структур – ионных каналов, которые образованы интегральными белками.

Движущей силой диффузии является не только разность концентрации ионов внутри и вне клетки, но также разность электрических потенциалов, создаваемых этими ио-

нами по обе стороны мембраны. Следовательно, диффузионный поток ионов определяется градиентом электрохимического потенциала (электрохимический градиент).

Ионные каналы мембраны представляют собой интегральные белки мембраны, которые образуют отверстия в мембране, заполненные водой. В плазматической мембране обнаружен ряд ионных каналов, которые характеризуются высокой специфичностью, допускающей перемещение только одного вида ионов. Существуют натриевые, калиевые, кальциевые и хлорные каналы. Каждый из них имеет так называемый селективный фильтр, который способен пропускать только определённые ионы. Существует несколько теорий, объясняющих избирательность ионных каналов плазматической мембраны.

Проницаемость ионных каналов может изменяться благодаря наличию ворот, определенных групп атомов в составе белков, формирующих канал. Конформационные изменения ворот переводят канал из открытого состояния в закрытое и наоборот. Механизмы регуляции положения ворот могут отличаться в различных каналах. Некоторые из них открываются при изменениях электрического потенциала мембраны. Другие открываются под действием специфических химических веществ, выполняющих сигнальные функции.

**Первично-активный транспорт.** Действие пассивного транспорта через мембрану, в ходе которого ионы перемещаются по их электрохимическому градиенту, должно быть сбалансировано их активным транспортом против соответствующих градиентов. В противном случае, ионные градиенты исчезли бы полностью, и концентрации ионов по обе стороны мембраны пришли бы в равновесие. Это действительно происходит, когда активный транспорт через мембрану блокируют охлаждением или путём использования некоторых ядов.

Существует несколько систем активного транспорта ионов в плазматической мембране (ионные насосы): 1) Натрий-калиевый насос; 2) Кальциевый насос; 3) Водородный насос.

Активный транспорт – перенос ионов против их электрохимических градиентов с использованием энергии метаболизма:

Натрий-калиевый насос существует в плазматических мембранах всех животных и растительных клеток. Он выкачивает ионы натрия из клеток и загнетает в клетки ионы калия. В результате концентрация калия в клетках существенно превышает концентрацию ионов натрия.

Натрий-калиевый насос – один из интегральных белков мембраны. Он обладает энзимными свойствами и способен гидролизовать аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ), являющуюся основным источником и хранилищем энергии метаболизма в клетке. Благодаря этому указанный интегральный белок называется натрий-калиевой АТФазой. Молекула АТФ распадается на молекулу аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и неорганический фосфат.

Таким образом, натрий-калиевый насос выполняет трансмембранный антипорт ионов натрия и калия. Молекула насоса существует в двух основных конформациях, взаимное преобразование которых стимулируется гидролизом АТФ. Эти конформации выполняют функции переносчиков натрия и калия. При расщеплении натрий-калиевой АТФазой молекулы АТФ, неорганический фосфат присоединяется к белку. В этом состоянии натрий-калиевая АТФаза связывает три иона натрия, которые выкачиваются из клетки. Затем молекула неорганического фосфата отсоединяется от насоса-белка, и насос превращается в переносчик калия. В результате два иона калия попадают в клетку. Таким образом, при расщеплении каждой молекулы АТФ, выкачиваются три иона на-

трия из клетки и два иона калия закачиваются в клетку. Один натрий-калиевый насос может перенести через мембрану 150-600 ионов натрия в секунду. Следствием его работы является поддержание трансмембранных градиентов натрия и калия.

Через мембраны некоторых клеток животного (например, мышечных) осуществляется первично-активный транспорт ионов кальция из клетки (кальциевый насос), что приводит к наличию трансмембранного градиента указанных ионов.

Водородный ионный насос действует в мембране бактериальных клеток и в митохондриях, а также в клетках желудка, перемещающего водородные ионы из крови в его полость.

**Вторично-активный транспорт.** Существуют системы транспорта через мембраны, которые переносят вещества из области их низкой концентрации в область высокой концентрации без непосредственного расхода энергии метаболизма клетки (как в случае первично-активного транспорта). Такой вид транспорта называется вторично-активным транспортом.

Вторично-активный транспорт некоторого вещества возможен только тогда, когда он связан с транспортом другого вещества по его концентрационному или электрохимическому градиенту. Это симпортный или антипортный перенос веществ.

При симпорте двух веществ ион и другая молекула (или ион) связываются одновременно с одним переносчиком прежде, чем произойдет конформационное изменение этого переносчика. Так как ведущее вещество перемещается по градиенту концентрации или электрохимическому градиенту, управляемое вещество вынуждено перемещаться против своего градиента.

Ионы натрия являются обычно ведущими веществами в системах симпорта клеток животного. Высокий электрохимический градиент этих ионов создается натрий-калиевым насосом. Управляемыми веществами являются сахара, аминокислоты и некоторые другие ионы. Например, при всасывании питательных веществ в желудочно-кишечном тракте глюкоза и аминокислоты поступают из клеток тонкой кишки в кровь путём симпорта с ионами натрия. После фильтрации первичной мочи в почечных гломерулах, эти вещества возвращаются в кровь той же системой вторично-активного транспорта.

**Эндоцитоз и экзоцитоз.** Макромолекулы – белки и нуклеиновые кислоты – не могут проникнуть через плазматическую мембрану с помощью механизмов транспорта, рассмотренных выше, из-за своих больших размеров. При трансмембранном транспорте больших молекул сама плазматическая мембрана подвергается согласованным перемещениям, вследствие которых часть жидкой внеклеточной поглощается (эндоцитоз) или часть внутренней среды клетки выделяется (экзоцитоз).

В процессе *эндоцитоза* плазматическая мембрана окружает часть внешней среды, формируя вокруг неё оболочку, в результате чего образуется везикула, которая поступает внутрь клетки. При *пиноцитозе* образуются небольшие, заполненные жидкостью везикулы. В процессе *фагоцитоза* формируются большие везикулы, которые содержат твердый материал, например, клетки бактерий.

При *экзоцитозе* транспортируемое вещество синтезируется в клетке, связывается мембраной в везикулы и экспортируется из клетки. Таким образом транспортируются из клетки специфические белки, нуклеиновые кислоты, нейромедиаторы и т.п.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие «биологическая мембрана».

- 2) Функции биомембран.
- 3) Химическая состав и структура плазматической мембраны.
- 4) Виды пассивного транспорта.
- 5) Принцип диффузии.
- 6) Облегченная диффузия
- 7) Свободная диффузия.
- 8) Облегченная диффузия неэлектролитов.
- 9) Электродиффузия (облегченная диффузия ионов).
- 10) Активный транспорт.
- 11) Первично-активный транспорт
- 12) Вторично-активный транспорт
- 13) Эндоцитоз и экзоцитоз

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Блинов, В.А. Биологические мембраны : учебно-методическое пособие / В.А. Блинов, В.И. Латышев. – Саратов : ИП «Экспресс тиражирование», 2009.
3. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Цитология с основами патологии клетки : учебное пособие / Ю.Г. Васильев, В.М. Чучков, Т.А. Трошина. – М.: Зоомедлит, 2007. – 231 с. – ISBN 978-5-91223-002-8
8. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

### *Дополнительная*

1. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
2. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М. : КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Блинов, В.А. Биологические мембраны : учебно-методическое пособие / В.А. Блинов, В.И. Латышев. – Саратов : ИП «Экспресс тиражирование», 2009.
4. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
5. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Емцев, В.Т. Микробиология : учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с. – ISBN 5-7107-7750-1
7. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
8. Жученко, А.А. Генетика : учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский ; ред. А. А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М. : КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2
9. Коничев, А.С. Молекулярная биология: учебник / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с. – ISBN 978-5-7695-9147-1
10. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей / В.Н. Лебедев. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014. – 62 с. - ISBN 978-5-8064-1970-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
11. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс : учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
12. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
13. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
14. Основы физики и биофизики: учебное пособие / ред.: А.И. Журавлев. – М.: Мир, 2005. – 383 с.
15. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
16. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
17. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
18. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
19. Цитология с основами патологии клетки : учебное пособие / Ю.Г. Васильев, В.М. Чуч-

ков, Т.А. Трошина. – М.: Зоомедлит, 2007. – 231 с. – ISBN 978-5-91223-002-8

20. Цымбаленко, Н.В. Биотехнология. Часть 1. Технология рекомбинантной ДНК [Электронный ресурс]: учебное пособие; доп. УМО / Н.В. Цымбаленко. – СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2011. – 127 с. // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

21. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов С.Н. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

22. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

23. Безбородов, А.М. Микробиологический синтез / А.М. Безбородов, Г.И. Квеситадзе. – СПб: Проспект Науки, 2011. – 144 с. – ISBN 978-5-903090-52-5

24. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173

25. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)

26. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

27. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4

28. Коничев, А.С. Основные термины молекулярной биологии: учебное пособие / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Колос, 2006. – 188 с. – ISBN 5-9532-0327-6

29. Курбатова, Н.С. Учебное пособие по общей биологии [Электронный ресурс] / Н.С. Курбатова, Е.А. Козлова. – Саратов: Научная книга, 2012. – 160 с. – ISSN 2227-8397 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

30. Медицинская биология и общая генетика [Электронный ресурс]: учебник / Р.Г. Заяц [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2012. – 496 с. – ISBN 978-985-06-2182-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

31. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

32. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков : учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М. : КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

33. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

34. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

35. Белок и все о нем: Электронный учебник о химическом составе, строении, свойствах и биологических функциях белковых молекул – [www.Belok-s.narod.ru](http://www.Belok-s.narod.ru)

36. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

37. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)

38. Научно-образовательный портал «Вся биология» - <http://sbio.info>

39. Портал о генетике – <http://eguerrieri.info>

40. Химический сервер – <http://www.himhelp.ru>

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	3
<b>Лекция 1. Клетка как основа наследственности и воспроизведения</b> .....	4
1.1. Строение и функции органелл клетки, химический состав клетки.....	4
Вопросы для самоконтроля.....	5
Список литературы.....	5
<b>Лекция 2. Жизненный цикл клеток и типы клеточного деления</b> .....	6
2.1. Интерфаза, amitoz, mitoz, meioz.....	6
2.2. Сравнительная характеристика эукариотической и прокариотической клетки.....	10
2.3. Сравнительная характеристика растительной и животной клетки.....	12
Вопросы для самоконтроля.....	12
Список литературы.....	13
<b>Лекция 3. Питание микроорганизмов и закономерности микробного роста</b> ....	14
3.1. Типы питания микроорганизмов.....	14
3.2. Теория лимитирования и ингибирования роста клеток элементами питания.....	15
3.3. Закономерности роста популяций микроорганизмов.....	15
Вопросы для самоконтроля.....	16
Список литературы.....	17
<b>Лекция 4. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы</b> .....	18
4.1. Биосфера и распространение микроорганизмов.....	18
4.2. Действие факторов химической и физической природы на микроорганизмы.....	20
4.3. Антимикробное действие антибиотиков.....	22
Вопросы для самоконтроля.....	23
Список литературы.....	23
<b>Лекция 5. Кинетические основы ферментативных и микробиологических процессов</b> .....	24
5.1. Кинетическое описание процесса роста микроорганизмов. Экспоненциальная модель роста.....	24
5.2. Кинетическое описание биосинтеза продуктов микроорганизмами.....	26
Вопросы для самоконтроля.....	27
Список литературы.....	27
<b>Лекция 6. Генетические основы селекции. Селекция микроорганизмов</b> .....	29
6.1. Понятие о генотипе и фенотипе.....	29
6.2. Наследственность, изменчивость и отбор микроорганизмов.....	29
6.3. Методы селекции микроорганизмов.....	30
Вопросы для самоконтроля.....	31
Список литературы.....	32
<b>Лекция 7. Принципы биоэнергетики в живых системах</b> .....	34
7.1. Пути и механизмы преобразования энергии в живых системах. Биологическое окисление.....	34
7.2. Окислительное фосфорилирование.....	37
Вопросы для самоконтроля.....	38
Список литературы.....	38
<b>Лекция 8. Биосинтетические процессы в клетках</b> .....	40
8.1. Синтез липидов.....	40
8.2. Синтез полисахаридов.....	43

8.3. Синтез нуклеиновых кислот.....	44
Вопросы для самоконтроля.....	45
Список литературы.....	46
<b>Лекция 9. Синтез белка (трансляция).....</b>	<b>47</b>
9.1. Характеристика стадий, роль нуклеиновых кислот в биосинтезе белка.....	47
9.2. Регуляция синтеза белка.....	48
Вопросы для самоконтроля.....	49
Список литературы.....	50
<b>Лекция 10. Регуляторные системы эукариот и прокариот.....</b>	<b>51</b>
10.1. Уровни регуляции.....	51
10.2. Регуляция активности ферментов.....	51
10.3. Регуляция репликации ДНК и транскрипции.....	53
10.4. Регуляция клеточного деления.....	54
Вопросы для самоконтроля.....	57
Список литературы.....	57
<b>Лекция 11. Молекулярные основы наследственности.....</b>	<b>59</b>
11.1. Природа генетического материала.....	59
11.2. Генетический код и его свойства.....	59
11.3. Механизмы репарации ДНК.....	60
Вопросы для самоконтроля.....	61
Список литературы.....	61
<b>Лекция 12. Исследование структуры и функций гена.....</b>	<b>63</b>
12.1. Цис- и транскомплементационный тест.....	63
12.2. Генетическое картирование.....	63
12.3. Секвенирование.....	65
12.4. Рестрикционный анализ.....	66
Вопросы для самоконтроля.....	67
Список литературы.....	67
<b>Лекция 13. Основы генной инженерии (технология рДНК).....</b>	<b>69</b>
13.1. Получение фрагментов чужеродной ДНК и их очистка.....	69
13.2. Включение фрагмента чужеродной ДНК в векторную плазмиду и получение рДНК.....	69
13.3. Введение рДНК в компетентные клетки и клонирование генов.....	70
13.4. Амплификация.....	72
13.5. Экспрессия рДНК.....	72
Вопросы для самоконтроля.....	73
Список литературы.....	73
<b>Лекция 14. Иммобилизация ферментов и клеток.....</b>	<b>75</b>
14.1. Источники ферментов.....	75
14.2. Преимущества иммобилизованных ферментов.....	76
14.3. Характеристика носителей для иммобилизации ферментов.....	76
14.4. Физическая иммобилизация ферментов.....	78
14.5. Химическая иммобилизация ферментов.....	80
14.6. Иммобилизация клеток и органелл.....	82
14.7. Соиммобилизация.....	82
Вопросы для самоконтроля.....	83
Список литературы.....	83
<b>Лекция 15. Биологические мембраны.....</b>	<b>84</b>

15.1. Строение, свойства и функции биомембран.....	84
15.2. Механизмы мембранного транспорта.....	86
Вопросы для самоконтроля.....	89
Список литературы.....	90
<b>Библиографический список.....</b>	<b>91</b>
<b>Содержание.....</b>	<b>93</b>