*1 слайд модуль 1*

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

Одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата (Средняя Азия, Крым) в открытых бассейнах со специальной питательной средой. К примеру, за теплый период года (6—8 месяцев) можно получить 50—60 т биомассы хлореллы с 1 га, тогда как одна из самых высокопродуктивных трав — люцерна дает с той же площади только 15— 20 т урожая.

Хлорелла содержит около 50 % белка, а люцерна — лишь 18 %. В целом в пересчете на 1 га хлорелла образует 20—30 т чистого белка, а люцерна — 2—3,5 т. Кроме того, хлорелла содержит 40 % углеводов, 7—10 % жиров, витамины А (в 20 раз больше), B2, К, РР и многие микроэлементы. Варьируя состав питательной среды, можно процессы биосинтеза в клетках хлореллы сдвинуть в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов.

При завоевании племен майя миссионерами описывался случай, когда испанцы около полутора лет осаждали крепость на вершине горы. Естественно, что все продукты давно должны были кончиться, однако крепость не сдавалась. Когда же она была наконец взята, то испанцы с удивлением увидели в ней небольшие пруды, где культивировались одноклеточные водоросли, из которых индейцы готовили особый сыр. Испанцы попробовали его и нашли весьма приятным на вкус. Однако это было уже после того, как испанцы уничтожили абсолютно всех защитников и секрет племени был утерян. В наше время делались попытки определить этот вид водорослей, из которых готовился сыр, но они не увенчались успехом.

 В пищу употребляют около 100 видов макрофитных водорослей

В целом ряде стран водоросли используют как весьма полезную витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных.

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

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является агар — полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Количество его доходит до 30—40 % от веса водорослей (водоросли лауренция и грацилярия, гелидиум). Водоросли — единственный источник получения агара, агароидов, каррагинина, альгинатов. В мире ежегодно получается более 16 тыс. т агара.

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

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

Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением — шестиатомным спиртом маннитом, который с успехом применяют в пищевой промышленности, фармацевтике, при производстве бумаги, красок, взрывчатки и др.

Водоросли

Водоросли используются, в основном, для получения белка. Весьма перспективны в этом отношении и культуры одноклеточных водорослей, в частности высокопродуктивных штаммов рода Chlorella и Scenedesmus. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве добавки в рационы скота, а также в пищевых целях. Одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата (Средняя Азия, Крым) в открытых бассейнах со специальной питательной средой. Варьируя состав питательной среды, можно процессы биосинтеза в клетках хлореллы сдвинуть в сторону накопления либо белков, либо углеводов, а также активировать образование тех или иных витаминов. Гидролизаты белка зеленой водоросли Scenedesmus используются в медицине и косметической промышленности. В Израиле на опытных установках проводятся эксперименты с зеленой одноклеточной водорослью Dunaliella bardawil, которая синтезирует глицерол. Эта водоросль относится к классу равножгутиковых и похожа на хламидомонаду. Dunadiella может расти и размножаться в среде с широким диапазоном содержания соли: и в воде океанов, и в почти насыщенных солевых растворах Мертвого моря. Она накапливает свободный глицерол, чтобы противодействовать неблагоприятному влиянию высоких концентраций солей в среде, где она растет. После переработки эти водоросли можно использовать в качестве корма для животных, так как у них нет неперевариваемой клеточной оболочки, присущей другим водорослям. Они также содержат значительное количество β-каротина. Таким образом, культивируя эту водоросль, можно получать глицерол, пигмент и белок, что весьма перспективно с экономической точки зрения. Наряду с кормами водоросли давно применяют в сельском хозяйстве в качестве удобрений.

Одним из самых ценных продуктов, получаемых из красных водорослей, является агар — полисахарид, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Водоросли — единственный источник получения агара, агароидов, каррагинина, альгинатов. В нашей стране основным источником агара служит красная водоросль анфельция.

Альгинат натрия — наиболее используемое соединение — способен поглощать до 300 весовых единиц воды, образуя при этом вязкие растворы. Бурые водоросли богаты также весьма полезным соединением — шестиатомным спиртом маннитом, который с успехом применяют в пищевой промышленности, фармацевтике, при производстве бумаги, красок, взрывчатки и др. Бурые водоросли в ближайшее время планируется использовать для получения биогаза.

Растения в биотехнологии

Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

1.Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливает ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений. Популяциям растительных клеток присущи специфические особенности: генетические, эпигенетические (зависящие от дифференцированной активности генов) и физиологические. При длительном культивировании гетерогенной по этим признакам популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которых соответствуют данным условиям выращивания, следовательно, популяция эволюционирует. Все это позволяет считать, что культуры клеток являются новой экспериментально созданной биологической системой, особенности которой пока мало изучены. Культуры клеток и тканей могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.

2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению.

Можно назвать несколько направлений создания новых технологий на основе культивируемых тканей и клеток растений:

1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения:

* традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение);
* синтез новых необычных соединений, что возможно благодаря исходной неоднородности клеточной популяции, генетической изменчивости культивируемых клеток и селективному отбору клеточных линий со стойкими модификациями, а в некоторых случаях и направленному мутагенезу;
* культивируемые в суспензии клетки могут применятся как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксилирования, метилирования, деметилирования, гликолизирования, изомеризации). В результате биотрансформации получают уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений других видов.

2. Ускоренное клональное микроразмно­жение растений, позволяющее из одного экпланта получать от 10000 до 1000000 растений в год, причем все они будут генетически идентичны.

3. Получение безвирусных растений.

4. Эмбриокультура и оплодотворение *in vitro* часто применяются для преодоления постгамной несовместимости или щуплости зародыша, для получения растений после отдаленной гибридизации. При этом оплодотворенная яйцеклетка вырезается из завязи с небольшой частью ткани перикарпа и помещается на питательную среду. В таких культурах можно также наблюдать стадии развития зародыша.

5. Антерные культуры – культуры пыльников и пыльцы используются для получения гаплоидов и дигаплоидов.

6. Клеточный мутагенез и селекция. Тканевые культуры могут производить регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала в результате сомаклонального варьирования. При этом в некоторых случаях можно обойтись без мутагенной обработки.

7. Криоконсервация и другие методы сохранения генофонда.

8. Иммобилизация растительных клеток.

9. Соматическая гибридизация на основе слияния растительных протопластов.

10.Конструирование клеток путем введения различных клеточных оганелл.

11.Генетическая трансформация на хромосомном и генном уровнях.

12. Изучение системы «хозяин – паразит» с использованием вирусов, бактерий, грибов и насекомых).

## Водоросли и биотехнология

Водоросли широко используются в биотехнологии.

С целью практического использования почвенных водорослей осуществляют регулирование динамики развития водорослей в почве для увеличения численности водорослей и увеличения накопления органического вещества в почве.

Сильными стимуляторами развития водорослей являются минеральные удобрения, действующие избирательно: азотные удобрения способствуют развитию зеленых и большинства синезеленых водорослей; фосфор и калий увеличивают численность азотфиксирующих синезеленых; калий стимулирует развитие диатомовых и иногда синезеленых водорослей.

Известкование кислых почв приводит к резкому возрастанию численности и разнообразия диатомей и азотфиксирующих синезеленых водорослей.

Альголизацию почвы проводят водорослями, выращенными в массовых количествах в специальных емкостях в производственных условиях.

С целью стимуляции роста корневой системы высших растений и повышения урожайности проводят предпосевную обработку культурами водорослей.

Водоросли используют как компоненты бактериальных удобрений и как биологические индикаторы. Водоросли могут быть использованы как индикаторы степени обсеменения среды бактериями и грибами различного систематического положения.

Микроскопические водоросли способны к синтезу веществ, обладающих стимулирующими или ингибирующими свойствами по отношению не только к другим видам водорослей или иных микроорганизмов, но и по отношению к высшим растениям.

Хлорелла синтезирует 13 витаминов из групп А, В, С, Д, К, никотиновую, пантеоновую, фолиевую кислоты, лейкофорин и биотин. При этом, витамина С в ее клетках (в весовых отношениях) содержится почти столько же, сколько в лимонах.

Кроме получения витаминов, водоросли в биотехнологии используются и как источники белков, незаменимых аминокислот, антибиотиков.

Синезеленые водоросли в водных культурах оказывают стимулирующее действие на рост хлопчатника. Так, живые клетки Nostoc punctiphorme и автолизированные клетки Anabaena oscillarioides более чем в 1,5 раза усиливают рост этих растений.

Водоросли могут оказывать влияние на плодородие почвы и через стимуляцию полезной спонтанной микрофлоры.

В ризосфере растений обнаруживается гораздо больше живых водорослей, чем вне зоны ее корней. Внесение водорослей, особенно совместно с азотбактеринеом, вызывает усиление развития олигонитофилов, аммонификаторов и других групп микроорганизмов. Усиливается развитие гетеротрофных азотфиксаторов.

Во многих случаях применение водорослей в качестве живого микроудобрения способствует прибавлению урожая и повышает плодородие почвы.

Водоросли составляют начало пищевых цепей, являясь пищей гетеротрофных микроорганизмов.

Органическое вещество водорослей прямо или косвенно пополняет запасы органического вещества почвы – происходит увеличение гумуса за счет деятельности водорослей. Слизистые вещества водорослей влияют на физические и химические свойства почвы. Способность водорослей к образованию биологически активных веществ позволяет предположить прямое влияние водорослей на высшие растения и особенно прорастающие семена.

Установлено, что зеленые водоросли Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliguus и их метаболиты, внесенные в почву, повышают активность сапрофитной микрофлоры, в частности грибов. Одновременно при этом снижается количество патогенных микроорганизмов, вызывающих болезни растений.

Зеленая водоросль хлорелла оказывает влияние на численность микроорганизмов. Под влиянием внесенной культуры хлореллы происходит перераспределение разных групп почвенных микроорганизмов.

Являясь постоянным источником веществ и энергии для почвенных гетеротрофов (бактерий, простейших, коловраток, нематод, дождевых червей и пр.), водоросли тем самым являются стимуляторами биологической активности почвы и должны рассматриваться как важный фактор процесса почвообразования и самоочистки почвы.

В биотехнологии такие водоросли, как хлорелла и протококковые, используются как биостимуляторы роста животных и птиц.

Внесение в почву, загрязненную нефтью, накопительной культуры микроорганизмов в сочетании с водорослями, а также с простейшими, стимулирует дыхание почвы, способствует повышению численности актиномицетов и микроорганизмов, использующих азот в органических и минеральных соединениях, разлагающих целлюлозу и окисляющих нефть, способствует ускорению самоочищения почвы от нефти.

Синезеленые водоросли и, несколько в меньшей степени, диатомовые водоросли играют существенную роль в обогащении пойменных почв органическим веществом. Водоросли создают вокруг себя среду чрезвычайно насыщенную разнообразными органическими веществами, многие из которых способны поглощать и удерживать большое количество воды и становятся ценообразователями.

Внесение в почву синезеленых водорослей, как правило, сопровождается усиленным развитием почвенной микрофлоры, в частности азотобактера, клостридий, олигонитрофилов, нитрофикаторов. Постоянными спутниками синезеленых водорослей в природных условиях являются не только бактерии, но и грибы.

Массовое культивирование азотфиксирующих синезеленых водорослей проводится для повышения плодородия почвы.

В настоящее время в биотехнологии массовое культивирование одноклеточных зеленых водорослей проводится с целью получения продуктов питания, кормов, органических веществ и биологической очистки сточных вод.

Биологический метод очистки сточных вод имеет большое преимущество, по сравнению с химическим и механическим методами.

Биологический метод с применением водорослей и высших водных растений ускоряет очистку сточных вод и сильно снижает концентрацию органо – минеральных веществ путем их поглощения. Сточные воды после биологической очистки оздоровляются, их санитарно – биологическое состояние улучшается в связи с появлением биологически активных веществ.

После биологической очистки в сточных водах исчезают различные патогенные микроорганизмы, появляются гидробионты (бактерии, фито- и зоопланктон, зообентос), в дальнейшем играющие главную роль в процессах самоочищения воды.

При применении биологического метода огромное количество сточных вод очищается, обеззараживается и становится возможным спуск воды в открытые водоемы.

Биологический метод очистки сточных вод охраняет открытые водоемы от загрязнения промышленными, коммунальными и бытовыми сточными водами.

Симбиотическое размножение одноклеточных зеленых водорослей и аэробных бактерий осуществляется для обеззараживания бытовых и промышленных вод с дальнейшим использованием растительного планктона.

В настоящее время для биологической очистки сточных вод стали применять протококковые водоросли. Эффект очистки достигается благодаря своеобразным симбиотическим взаимоотношениям между гетеротрофными бактериями (в процессе жизнедеятельности которых разрушается органическое вещество) и автотрофными водорослями, которые в процессе фотосинтеза из продуктов минерализации органических веществ загрязнения, вновь создают для себя органические вещества.

Водоросли успешно выращиваются на стоках дрожжевых, спиртовых и пивоваренных заводов, заводов по производству искусственного волокна, на сточных водах угольных шахт, предприятий первичной обработки шерсти, молочных заводов, целлюлозо – бумажного производства, крахмало – паточных и сахарных заводов, а также стоков многих других предприятий.

В сточных водах одноклеточные водоросли питаются гетеротрофно, миксотрофно и автотрофно. Водоросли извлекают из окружающей среды необходимые питательные вещества всей поверхностью своего тела.

Источником углерода для них в процессе фотосинтеза является углекислота. Водоросли могут использовать хлористый аммоний1, углекислый аммоний, способны также утилизировать некоторые органические соединения азота (мочевину, аспарагин, глютамин, пептон, альбумин и др.). Зеленые водоросли интенсивнее развиваются на органическом азоте, чем на минеральном.

Хорошие результаты получены при использовании симбиотической смеси, содержащей водоросли и активный ил. При доминировании в такой смеси Chlorella, Scenedesmus, Anaboena, Oscilatoria загрязнение снижается до 80 – 90%. Симбиотический активный ил более полно, чем бактериальный, извлекает биогенные элементы.

Культуральные штаммы Chlorella и Scenedesmus добавленные в водоем, загрязненный нефтью, удаляют нефтепродукты, устраняют запах керосина.

Эти водоросли способствуют очищению воды от кишечной микрофлоры и обогащают воду кислородом.

Предполагают, что гибель бактерий может быть связана с тем, что в процессе жизнедеятельности водоросли выделяют в среду метаболиты токсичные для бактерий. Гибель бактерий может быть связана и с высоким окислительно – восстановительным потенциалом, устанавливающимся в зоне интенсивно развивающихся водорослей.

Применение смеси водорослей (хлорелла, сценедесмус, синезеленые, диатомовые) с бактериями, жгутиковыми и инфузориями в количестве нескольких миллионов клеток на один литр сточной воды ускоряет очистку в контактных биопрудах в 1,5 – 2,0 раза.

Водоросли не толь активно поглощают различные примеси, содержащиеся в сточных водах, но и способствуют их интенсивному окислению и минерализации, выделяя большое количество кислорода при фотосинтезе.

Chlorella и Scenedesmus хорошо развиваются и очищают воду открытых водоемов при наличии фенола в количестве в десятки раз превосходящем предельно допустимые концентрации.

В зависимости от происхождения и состава загрязненных вод с целью очистки их возможно использование и нитчатых зеленых водорослей.

Доочистку сточных вод от минеральных и органических веществ можно производить применяя культиваторы зеленых нитчатых водорослей, которые обеспечивают максимальную эффективность очистки воды, проходящей через биопоглотитель. Изъятая после этого биомасса зеленых нитчатых водорослей может быть использована как дополнительный источник содержащего белок корма, богатого каротином и витаминами группы В.

Такой способ целесообразен на животноводческих фермах.

Второй способ использования зеленых нитчатых водорослей при очистке водя связан с непосредственным их культивированием в водоеме. Зеленые нитчатые водоросли, особенно Cladophora facta, активно поглощают калий, серу, кальций, кобальт, цинк, кадмий, стронций, рубидий, свинец и др.

Поглощение этих веществ нитчатыми водорослями осуществляется более интенсивно, чем одноклеточными Поглощение органических веществ нитчатыми водорослями связано с их гетеротрофным типом питания.

*Водоросли, систематика, разнообразие. Гидроколлоиды морских водорослей, разнообразие,*

*применение. Водоросли*(лат. *Algae*) — гетерогенная экологическая группа преимущественно фототрофных одноклеточных, колониальных или многоклеточных организмов, обитающих в водной среде, в систематическом отношении представляющая собой совокупность многих отделов. Вступая в симбиоз с грибами, эти организмы в ходе эволюции образовали совершенно новые организмы — лишайники. Наука о водорослях называется альгологией.

Водоросли — группа организмов различного происхождения, объединённых следующими признаками: наличие хлорофилла и фотоавтотрофного питания; у многоклеточных — отсутствие чёткой дифференцировки тела (называемого слоевищем, или талломом) на органы; отсутствие ярко выраженной проводящей системы; обитание в водной среде или во влажных условиях (в почве, сырых местах и т. п.). Они сами по себе не имеют органов, тканей и лишены покровной оболочки. Некоторые водоросли способны к гетеротрофии (питанию готовой органикой), как осмотрофной (поверхностью клетки), например жгутиконосцы, так и путём заглатывания через клеточный рот (эвгленовые, динофитовые). Размеры водорослей колеблются от долей микрона (кокколитофориды и некоторые диатомеи) до 30—50 м (бурые водоросли — ламинария, макроцистис, саргассум)[1]. Таллом бывает как одноклеточным, так и многоклеточным. Среди многоклеточных водорослей наряду с крупными есть микроскопические (например, спорофит ламинариевых). Среди одноклеточных есть колониальные формы, когда отдельные клетки тесно связаны между собой (соединены через плазмодесмы или погружены в общую слизь).

К водорослям относят различное число (в зависимости от классификации) отделов эукариот, многие из которых не связаны общим происхождением. Также к водорослям часто относят сине-зелёные водоросли или цианобактерии, являющиеся прокариотами. Традиционно водоросли причисляются к растениям.

*Гидроколлоиды морских водорослей: применение в биотехнологии и технологии пищевых продуктов.*

Гидроколлоиды морских водорослей - агар, каррагинан, альгинат – являются полифункциональными пищевыми добавками, которые не только регулируют структуру продуктов, но и модифицируют их пищевую и биологическую ценность. Назначение полисахаридов определяется их физико – химическими свойствами, такими как структурный состав, катионный состав, вязкость водных растворов, прочность гелей.

Так, агар – это самостоятельный гелеобразователь, который не нуждается во вспомогательных ингредиентах и образует прочные гели благодаря содержанию в нем агарозы. Каррагинан образует термообратимые гели в присутствии определенных катионов и при этом обладает целым спектром реологических свойств: от вязкого загустителя до гелеобразователя. Этот полисахарид имеет высокое сродство к молочному белку, что широко используется для стабилизации молочных продуктов. Гелеобразующие свойства каррагинанов можно регулировать добавлением других полисахаридов, например альгината, что ведет к изменению структуры геля. Альгинаты характеризуются широким разбросом вязкости, устойчивостью к действию кислот, высоких и низких температур, что выгодно отличает их от других полисахаридов. Совместимость альгината с белками и другими полисахаридами делает возможным его использование при производстве эмульсионных продуктов.

Пищевые продукты представляют собой много компонентные системы, содержащие белки, жиры, углеводы, соль, витамины и значительное количество воды. Сложное взаимодействие этих компонентов с водой и друг с другом формирует свойства пищевых продуктов. Для получения устойчивых пищевых систем применяются специальные технические средства, технологические процессы и приемы биотехнологии. Однако этого часто оказывается не достаточно. С целью придания пищевым продуктам требуемой консистенции или ее улучшения в качестве загустителей и гелеобразователей используют морские гидроколлоиды. По своей химической природе они являются полимерами с равномерно распределенными гидрофильными группами. При этом один и тот же гидроколлоид в зависимости от его концентрации в пищевом продукте может играть роль как загустителя, так и гелеобразователя. Их вносят в продукты с разнообразными технологическими целями: для загущения, эмульгирования, водоудержания, а также для предотвращения синерезиса, флокуляции и седиментации, ингибирования кристаллизации и черствения в процессе хранения.

Способность полисахаридов водорослей образовывать гели широко используют в пищевой промышленности при получении гелеобразных продуктов. В структурную сетку гелеобразных систем кроме полисахаридов включаются частицы жира, белка, воды, твердых веществ. В таких системах гелеобразование либо подавляется, либо усиливается, а консистенция продукта сильно отличается от консистенции индивидуальных полисахаридов. При этом важна последовательность введения и продолжительность технологических операций. Также необходимо учитывать и такие факторы, как влияние полисахаридов на вкусовые и структурные характеристики продукта и его пищевую и биологическую ценность, синергизм и антогонизм при совместном использовании компонентов, температуру и давление при технологической обработке и др.

Агар применяется при изготовлении желе, соусов, глазури, кондитерских изделий и заливных, а также как вещество, улучшающее текстуру, замедляющее черствение и потерю вкуса хлебобулочных изделий. Кроме того, этим полисахаридом стабилизируют многие консервы, сиропы, майонез, начинки и покрывают кондитерские изделия. Также целесообразно его использование при изготовлении консервов, поскольку он не теряет своих гелеобразующих свойств после стерилизации и более устойчив к нагреву в кислой среде по сравнению с каррагинаном.

Наряду с агаром каррагинаны все чаще применяются для получения желейно – мармеладных изделий. Они характеризуются широким спектром реологических свойств, их гели имеют затяжистую консистенцию, обладают пластичностью и не имеют стекловидного излома, характерного для агара. Желейные основы, в которых содержится каррагинан, быстро застывают (в течение 15 – 20 мин.) и сохраняют структуру при температуре выше 300С, что особенно актуально для регионов с высокими летними температурами. Формирование геля для κ – каррагинана происходит в присутствии ионов калия хлорида, сорбатаицитрата, которые стабилизируют концентрацию водородных ионов и задерживают гидролиз каррагинана в кислой среде.

В Тинро – Центре были проведены исследования по установлению влияние сахара, лимонной кислоты, цитрата калия на прочность пищевых систем в присутствии каррагинана. Установлено, что взаимодействие каррагинана с сахаром выражено сильнее по сравнению с традиционно используемым агаром. Содержание сахара в концентрации 50 % в системе с каррагинаном обеспечивает получение твердой системы, аналогичной при содержании 70 % сахара в присутствии агара. Добавление лимонной кислоты в концентрации 0,5 - 0,6 % снижает прочность системы каррагинан – сахар до 250 г/см 2. Для снижения степени деградации каррагинанав кислой среде вносят цитрат калия, концентрация которого рассчитывается, исходя из соотношения каррагинан – лимонная кислота – цитрат калия, соответственно 2:1:1. Следует отметить, что при обоснованных соотношениях компонентов каррагинан – пищевые добавки система становится твердой, ее прочность находится в пределах 800 г. Таким образом, применение каррагинана позволяет получать гелеобразные изделия с пониженным содержанием сахара и лимонной кислоты по сравнению с традиционными продуктами.

Гелеобразующие свойства гидроколлоидов можно регулировать, комбинируя их фракции или добавляя другие гидроколлоиды. Так, совместное применение каппа – ийота – каррагинанов делает возможным получение прочных и достаточно эластичных гелей [8]. Добавление нежелирующих загустителей к гелеобразователям уменьшает синерезис, а также ведет к улучшению стабильности геля при замораживании - оттаивании. Например, добавление загустителя из рожкового дерева к каррагинану изменяет текстуру его геля, он становится более эластичным и менее подверженным синерезису [9]. Использование смеси полисахаридов происходит несколькими способами. Во-первых, путем механического смешивания полисахаридов. Во-вторых, это может быть смесь биосовместимых, химически сшитых полисахаридов.

При разработке технологий желейных изделий на основе полисахаридов водорослей проводили исследования по регулированию реологических свойств и структуры пищевых систем с использованием каррагинана в смеси с другими полисахаридами. Установлено, что структура желе с учетом вносимых пищевых добавок обеспечивается сочетанием низких концентраций двух полисахаридов: каррагинана и альгината. Введение 0,4 % альгината модифицирует структурно – механические свойства продукта и придает ему эластичную и нежную консистенцию. Следует также отметить, что структурно – механические свойства желейных систем зависят в большей степени от концентрации ионо зависимых полисахаридов и в меньшей степени от содержания пище вкусовых добавок.

Так, использование каррагинанов в мясной промышленности придает необходимые структурно – механические свойства цельномышечным, эмульгированным и рубленым мясным продуктам; позволяет сохранять и удерживать влагу; предотвращает образование бульонных оттоков при термообработке, что, в свою очередь, снижает содержание жира и значительно увеличивает выход готовой диетической эмульгированной продукции. Так, использование каррагинанов в мясной промышленности придает необходимые структурно – механические свойства цельномышечным, эмульгированным и рубленым мясным продуктам; позволяет сохранять и удерживать влагу; предотвращает образование бульонных оттоков при термообработке, что, в свою очередь, снижает содержание жира и значительно увеличивает выход готовой диетической эмульгированной продукции.

В последние годы в рыбной промышленности наблюдается использование различных объектов промысла, в том числе рыб, мало пригодных в технологическом плане для выпуска пищевой продукции. Рациональная обработка этого сырья предполагает применение новых технологических способов и приемов обработки, а также разнообразных пищевых добавок, придающих ей определенные структурно – механические свойства. Производство продуктов питания на основе рыбного фарша – это перспективное направление, обеспечивающее население высококачественной пищевой продукцией. Введение каррагинанов в фарш позволяет получать рыбные изделия с однородной консистенцией, улучшить вкус, аромат, структур у готовых продуктов (сосиски, рулеты, котлеты, паштеты), которые сохраняют свои свойства в процессе замораживания и оттаивания.

При разработке технологии паштетообразного продукта со структурой суфле е были обоснованы концентрации и соотношение полисахаридов, обеспечивающие однородность продукта и отсутствие синерезиса. Установлено, что при внесении смеси каррагинан – альгинат (соответственно 0,5 - 1,5%) в рыбный фарш наблюдается отсутствие отделения воды или геля в консервах и достигается умеренно плотная консистенция. После стерилизации рыбных консервов водоудерживающая способность повышается до 56 % и, как следствие, предельное напряжение сдвига увеличивается в 4,8 - 10,2 раза, что, вероятно, связано с образованием прочных связей каррагинана с белком. Применение смеси гидроколлоидов в технологии фаршевых изделий позволяет использовать фарш без предварительного бланширования и получить продукт, обладающий высокими реологическими свойствами.

Специфическое взаимодействие с белками – характерная реакция для гидроколлоидов морских водорослей. Гидроколлоиды взаимодействуют с белками через сульфатные и карбоксильные группы с заряженными группами белков. Реакция зависит от соотношения полисахарид - белок, изоэлектрической точки белка, рН и соотношения полисахарид: белок. Если реакция в этой системе протекает выше изоэлектрической точки белка, то происходит увеличение вязкости, если ниже, то результатом взаимодействия будет сопреципитация.

Агар в составе сухих смесей с другими гелеобразователями используют при производстве разнообразных пищевых продуктов, например, для приготовления заварного крема, йогурта, глазури, соусов, сквашенных десертных продуктов.

Промышленная переработка молока традиционными способами в сливочное масло, сыр, творог неизбежно связана с получением побочных продуктов: обезжиренного молока, пахты и молочной сыворотки. Так, выход молочной сыворотки колеблется в пределах 65 – 80 %. Для более полного использования молочного сырья установлена возможность получения гелеобразных продуктов на основе творожной сыворотки за счет использования в качестве структурообразователя агара. Структурообразование творожной сыворотки агаром является процессом перехода коллоидного состояния золя сыворотки в коллоидное состояние геля сывороточно – агаровых систем. Изменение структурно – механических характеристик происходит за счет уменьшения активности воды посредством участия ионов водорода, сахарозы и гидратированных молекул стабилизатора.

Агар обеспечивает структурообразующий эффект при концентрации от 0,2 до 1 % и влияет на формирование и механические свойства гелей в обезжиренном молоке. Добавление полисахаридав молоко приводит к изменению реологического состояния системы, то есть переходу из жидкого в структурированное состояние. При чем фазовое поведение зависит от концентрации полисахарида. В диапазоне концентраций агара 0,5 – 1 % прочность молочно – агаровых систем увеличивается пропорционально массовой доли агара.

В промышленности широко используется взаимодействие каррагинана с молочным белком, где он выступает одновременно в роли и стабилизатора, и гелеобразователя. Концентрация каррагинана, достаточная для суспензирования молока, составляет 0,01 - 0,03 %. Он стабилизирует жир в мороженом сгущенном молоке, детских молочных смесях, растительном масле для салатов. Растворение каррагинана в молоке производят при температуре 700 С. При этом казеин включается в гелевую сеть, что защищает его от взаимодействия с ионами кальция. Гель образуется при охлаждении молока благодаря наличию в нем ионов кальция и калия.

Каррагинаны широко используются при производстве йогуртов, пудингов и других молочных десертов для улучшения и сохранения их структуры и консистенции.

В настоящее время полисахариды водорослей широко используются при получении пищевых эмульсий. Пищевые эмульсионные продукты представляют собой тонко дисперсные, вязкие, устойчивые системы, включающие воду и жировые фазы, а также другие компоненты: белки, углеводы, минеральные вещества, красители, витамины. Как правило, эти системы имеют коагуляционную структуру и обладают тиксотропией.

Полисахариды водорослей – гидрофильные полимеры, которые не выказывают значительной поверхностной активности. Однако, как стабилизаторы пищевых эмульсий, они могут включаться в межфазные слои и проявлять свойства поверхностно – активных веществ (ПАВ). Исследования подтвердили, что гидроколлоиды могут адсорбироваться на жировых каплях и предотвращать расслоение эмульсий за счет сферического эффекта.

Но основное влияние гидроколлоидов проявляется в их способности повышать вязкость дисперсионной среды, препятствуя агрегации капель. Поэтому чаще говорят о стабилизирующей, а не об эмульгирующей функции полисахаридов водорослей. Кроме этого, промышленные образцы полисахаридов часто содержат небольшое количество белка (до 5 %). В основном эти белковые примеси гидрофобны. Связываясь с гидрофильными молекулами полисахаридов, они придают поверхностно – активные свойства образцам полисахаридов в целом.

Эмульгирующие свойства полисахаридов водорослей главным образом связаны с их способностью повышать вязкость пищевых систем. Так, добавление альгината в соусы, майонезы, кремы улучшает их взбиваемость, устойчивость при хранении, предохраняет от расслаивания. Альгинаты и каррагинаны перспективны как добавки, повышающие водоудерживающую способность, эластичность и стабильность при хранении и тепловой обработке мясных и рыбных фаршей. Наряду с альгинатами каррагинаны также используют как стабилизаторы эмульсий. Каррагинан превосходит агар и альгинаты в тех случаях, когда требуется высокая вязкость, эмульгирование и суспендирование.

Было исследовано взаимное влияние различных видов полисахаридов, масел и пищевых добавок на стойкость эмульсионных систем. Установлено, что полисахариды водорослей в небольших концентрациях (0,2 % каррагинана, 1 % альгината) позволяют создавать стойкие эмульсионные системы, используемые для получения соусов майонезных с пониженным содержанием жирового компонента по сравнению с традиционными.

Другая область использования гидроколлоидов – это получение хроматографических и диагностических препаратов, питательных сред и матриц для микробиологических и биотехнологических исследований. Наибольший практический интерес в этой области представляет высокоочищенный агар и агароза, которая является фракцией агара.

Агар, который применяется в микробиологии для изготовления микробиологических питательных сред, должен быть высокой степени очистки, обеспечивать оптимальную плотность, обладать высокой устойчивостью к ферментативному действию культивируемых микроорганизмов и обеспечивать усвоение последними питательных веществ. Агаровый гель устойчив при хранении, мало чувствителен к изменениям температуры в интервале - 1...900 С и воздействию ферментов бактерий. Для оценки качества агара проводят специальные микробиологические исследования, основу которых составляют следующие положения: каждая живая микробная клетка способна размножаться и давать видимую невооруженным глазом колонию; любая колония вырастает не более чем из одной микробной клетки.

Устойчивость агарового геля к действию большинства бактерий делает его незаменимым для приготовления питательных сред при их выращивании. Исследования биотехнических показателей питательных сред на основе высоко очищенного агара, полученного по технологии ТИНРО - Центра, при использовании штаммов кишечной палочки, золотистого стафилококка, возбудителей дизентерии показывают типичный рост и морфологию изолированных колоний, а также стабильность основных биологических свойств культур микроорганизмов.

Испытания образцов агарозы из Аhnfeltiatobuchiensis, продемонстрировали целесообразность ее использования для селекции продуцентов антибиотиков – стрептомицина и пенициллина – и производства на ее основе питательных сред. Продуцент пенициллина хорошо формируется в спорообразующие колонии с типичной формой.

Агароза – единственный из известных термообратимых и независящих от ионов гелеобразователей – используется в специальной биохимической лабораторной технике биохимических, биотехнологических, иммунологических, молекулярно – биологических исследований. На ее основе производятся особо чистые и прочные гели для гель - хроматографии, электрофореза, и иммуно - электрофореза и иммуно - диффузии.

В современной биохимии молекулярной биологии все чаще применяют чистые биополимеры: белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты. Для их выделения, очистки, анализа используется агароза, поскольку ее гели идеальны для диффузии электрокинетического движения биополимеров. Из агарозы получают разнообразные носители для гелевой, ионообменной, аффинной хроматографии. По сравнению с полиакриламидными гелями и сефадексами гели агарозы обладают большей жесткостью и выдерживают более высокие давления. Гранулированные агарозные гели получают сшиванием водородными мостиками агарозы.

Для улучшения химической и термической стабильности гелей применяют поперечное сшивание агарозных цепей с участием истинных ковалентных связей. Агарозные гранулированные гели используют для выделения и фракционирования очень крупных молекул, в том числе вирусов, рибосом, белков, бактериофагов, полисахаридов, нуклеиновых кислот. В отличие от других носителей они характеризуются более широкими интервалами фракционирования при рН = 3 - 14, их можно многократно стерилизовать в автоклаве, проводить хроматографию при температуре выше 700 С, что позволяет легко очищать гель.

В биотехнологии широко применяется каппа - каррагинан. Водные растворы каппа – каррагинана образуют прочные, прозрачные, термообратимые гели. Стабильность гелей каппа – каррагинана при механическом воздействии выше, чем агарозного геля при одинаковой концентрации полимера. Живые клетки, клеточные органеллы, ферменты могут быть инкапсулированы или иммобилизованы в каппа - каррагинане. При использовании каррагинана для иммобилизации клеток обычно исследуется его цитотоксичность по эффективности клонирования клеток.

Интересным представляется использование смеси гидроколлоидов – каррагинана и альгината, - обладающих разными физико – химическими свойствами, в биотехнологии. Добавление каррагинанов к альгинатам, используемым для иммобилизации клеток животных, модифицирует биологическое воздействие полученного матрикса на включенные в него клетки. В Ассоциации клеточных культур (г. Санкт - Петербург) были испытаны образцы каррагинана, произведенного по разработанной в ТИНРО – Центре технологии. Получены положительные заключения о возможности его применения в цитологии для иммобилизации клеток животных в смеси с альгинатом для изготовления гранул, структурно – механические свойства которых способствуют поддержанию жизнеспособности клеток. Установлено, что напряжение при сжатии гранул из смеси альгинат – каррагинан (90: 10; 70: 30) составляет 3600 – 4400 Па.

Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что гидроколлоиды морских водорослей являются незаменимыми компонентами в производстве продуктов питания, при получении хроматографических и диагностических препаратов, питательных сред и матриц в микробиологических и биотехнологических исследованиях.

Вопросы по теме:

1. *Где применяются гидроколлоиды морских водорослей?*
2. *Какие вы знаете гидроколлоиды морских водорослей?*

***Простейшие в биотехнологии***

*Простейшие - нетрадиционный объект в биотехнологии. Простейшие рубца жвачных животных и их роль в биотехнологии. Эвглениды. Трипаносомиды.*

*Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. До недавнего времени они использовались лишь как компонент активного ила при биологической очистке сточных вод. В настоящее время они привлекли внимание исследователей как продуценты биологически активных веществ.*

*В этом качестве рациональнее использовать свободноживущих простейших, обладающих разнообразными биосинтетическими возможностями и потому широко распространенными в природе.*

*Особую экологическую нишу занимают простейшие, обитающие в рубце жвачных животных. Они обладают ферментом целлюлазой, способствующей разложению клетчатки в желудке жвачных. Простейшие рубца могут быть источником этого ценного фермента. Возбудитель южноамериканского трипаносомоза — Trypanosoma (Schizotrypanumcruzi) стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (СССР) и его аналога — трипанозы (Франция). Изучая механизм действия этих препаратов, советские ученые (Г.И. Роскин, Н.Г. Клюева и их сотрудники), а также их французские коллеги (Ж. Кудер, Ж. Мишель – Брэн и др.) пришли к выводу, что эти препараты оказывают цитотоксический эффект при прямом контакте с опухолью и ингибируют ее опосредованно, путем стимуляции ретикулоэндотелиальной системы. Выяснилось, что ингибирующее действие связано с жирнокислотными фракциями. Характерной особенностью этих организмов является высокое содержание ненасыщенных жирных кислот, составляющее у трипаносомид 70 — 80 %, а у Astasialonga (свободноживущий жгутиконосец) — 60 % от суммы всех жирных кислот. У жгутиконосцев фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты имеют такой же состав и строение, как в организме человека и животных. В мире микробов полиненасыщенные жирные кислоты не синтезируются, а многоклеточные животные или растения представляют собой более ограниченную сырьевую базу, чем простейшие, культуры которых можно получать методами биотехнологии независимо от времени года или климатических условий.*

*Поскольку липидный метаболизм простейших обладает относительной лабильностью, были изучены пути его регуляции. Применение к простейшим общепринятого в микробиологии приема повышения биосинтеза липидов за счет снижения содержания в среде источника азота и увеличения содержания источника углерода привело к резкому торможению или остановке роста культур. Для создания условий направленного биосинтеза липидов в среды для культивирования жгутиконосцев добавляли предшественники и стимуляторы биосинтеза липидов: малонат, цитрат, сукцинат, цитидиннуклеотиды в сочетании с определенным режимом аэрации.*

*Российские ученые получили водорастворимый полусинтетический препарат — астазилид, представляющий собой комплекс эфиров сахарозы и жирных кислот, предварительно выделенных из А. longa. Для изучения активности и механизма действия этого препарата были применены различные модели: бислойные липидные мембраны (БЛМ), монослойные культуры почки теленка и карциномы яичника человека, иммунокомпетентные клетки — перитонеальные макрофаги. Было установлено, что астазилид вызывает увеличение проводимости, поверхностного натяжения, а также уменьшение электромеханической стабильности БЛМ.*

*Полученные данные позволяют предполагать, что в основе физиологических эффектов препарата лежит его значительное мембраноактивное действие. Астазилид проявляет мягкие детергентные свойства. Возможно, что увеличение проводимости и некоторая дестабилизация клеточных мембран открывают путь для проникновения внутрь клетки Ca 2 + и других ионов, играющих ключевую роль в регуляции метаболизма. При изучении действия астазилида на культуру клеток почки теленка было установлено, что препарат увеличивает митотический индекс клеток, снижает их полиморфизм, улучшает адгезивные свойства культуры, обеспечивает более плотное сцепление с субстратом и усиление межклеточных контактов.*

*Препарат не обладал прямым цитотоксическим действием на культуру опухолевых клеток, а его противоопухолевое действие, изученное на 8 штаммах перевиваемых опухолей мышей и крыс, реализовалось через иммунную систему. Астазилид действовал главным образом на клеточное звено иммунитета, вызывая повышение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, увеличение способности индуцировать развитие гиперчувствительности замедленного типа и некоторых других показателей. Препарат предотвращал гибель 60 — 80 % животных, зараженных бактериальными инфекциями (Е. coli, Ps. aerugenosa). Другой группой биологически активных веществ простейших являются полисахариды.*

*Разнообразие полисахаридов, синтезируемых простейшими, достаточно велико. Особый интерес представляет парамилон, характерный для эвгленоидных жгутиконосцев. Представители родов Astasiaи Euglena способны к сверхсинтезу парамилона, составляющему свыше 50 % сухого остатка клеток. Этот полисахарид изучается как стимулятор иммунной системы млекопитающих. В наших опытах парамилон A. Longa обладал выраженным противоопухолевым эффектом. Действуя опосредованно через иммунную систему, парамилон тормозит рост саркомы 180 на 60 % и снижает прививаемость аденокарциномы Эрлиха. Аденокарцинома Эрлиха вообще не прививалась у 50 — 60 % мышей, которым профилактически был введен парамилон в дозах 3 и 30 мг/ кг веса животного. Парамилон, выделенный из А. longa, практически нетоксичен. Выраженное иммуномодулирующее действие и низкая токсичность этого препарата являются предпосылкой для его углубленного исследования в сочетании с препаратами прямого противоопухолевого действия, радиотерапией и другими адъювантами.*

*В настоящее время в мире придается большое значение производству глюканов не только для медицинских целей, но и для пищевой и текстильной промышленности. До сих пор глюканы получали из культур бактерий или морских водорослей. Эвглениды являются одним из наиболее перспективных источников этого вещества. Структурные полисахариды, входящие в состав клеточных мембран простейших, — это гетерополисахариды, содержащие глюкозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, рибозу, галактозу, рамнозу, фруктозу, глюкозамин. Наиболее характерными гетерополисахаридами являются арабиногалактаны, Д – галакто – Д - маннан, фосфаноглюканы и другие.*

*Большой интерес представляет выяснение антигенной взаимосвязи между непатогенными и патогенными для человека видами трипаносомид. Установлено, что при введении мышам полисахаридов из культур непатогенных для человека простейших — Herpetomonass p. И Crithidiafasciculata — повышалась резистентность животных к Т. cruzi, возбудителю болезни Чагаса у человека. Наличие перекрестных иммунологических реакций между полисахаридами различных типов послужило основанием для вывода о том, что антигенная общность между этими веществами обусловлена не структурой полимера, а отдельными мономерами или олигомерами одинакового химического строения.*

*Биомасса простейших содержит до 50 % белка. Его высокая биологическая ценность заключается в том, что он содержит все незаменимые аминокислоты, причем содержание свободных аминокислот на порядок выше, чем в биомассе микроводорослей, бактерий и в мясе. Это свидетельствует о широких возможностях применения свободноживущих простейших в качестве источника кормового белка.*

Вопросы по теме:

1. *Какие вы знаете простейшие?*
2. *В каких производствах используются простейшие?*

*Питательные среды для растительных биотехнологических объектов*

Успех в культивировании объектов зависит от правильного выбора питательной среды и тщательности её приготовления. В состав питательных сред входят *макро- и микроэлементы* (N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Zn, Cu, Co, Mn, J, Mo); *витамины* В1, В6, В12, РР и другие; *углеводы* (сахароза, глюкоза, маннит); *фитогормоны*(чаще всего *цитокинины* и *ауксины* в определенном соотношении). Ауксины вызывают клеточную дедифференцировку, цитокинины индуцируют деление дедифференцированных клеток и необходимы для получения каллусных тканей. На средах без гормонов растут “привыкшие” и опухолевые ткани.

Для получения стеблевого морфогенеза снижают содержание ауксинов. Из ауксинов чаще всего применяют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) - 0.1-10 мг/л, нафтилуксусную кислоту (НУК) - 0.1-2 мг/л, ИУК - 1-30 мг/л.Для индукции каллусогенеза используют более высокие концентрации ауксинов, в дальнейшем ткань может расти при более низком содержании ауксинов.В качестве цитокининов используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), зеатин (0.001-10 мг/л); из них кинетин наименее активен. В состав некоторых сред входит аденин. Иногда используют гибберелловую кислоту (ГК). В качестве рост активаторов применяют также кокосовое молоко, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и др. Состав питательных сред для культивирования биотехнологических объектов зависит от типа их питания:- среда без глюкозы - для хлореллы, цианобактерий;- среда без витаминов и гормонов - для грибов (фузариума, ботритиса) и для ряски (Lemna);

- среда с азотом, сахарами, витаминами и гормонами - для культивирования клеток и тканей высших растений.

Разработано много питательных сред, но большинство из них представляют модификации основных: Мурасиге-Скуга (МС), Уайта, Шенка-Хильдебрандта, Гамборга (В5), Линсмайера-Скуга, Хеллера, Чапека и др. Составы питательных сред, получивших наибольшее распространение приведены в справочниках по физиологии растений и биотехнологии. На сайте вы найдете прописи для базовых сред для культивирования растительных клеток: среда Мурасиге-Скуга и среда Гамборга, некоторые микробиологические среды.

*Питательные среды для растительных биотехнологических объектов*

Успех в культивировании объектов зависит от правильного выбора питательной среды и тщательности её приготовления. В состав питательных сред входят *макро- и микроэлементы* (N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Zn, Cu, Co, Mn, J, Mo); *витамины* В1, В6, В12, РР и другие; *углеводы* (сахароза, глюкоза, маннит); *фитогормоны*(чаще всего *цитокинины* и *ауксины* в определенном соотношении). Ауксины вызывают клеточную дедифференцировку, цитокинины индуцируют деление дедифференцированных клеток и необходимы для получения каллусных тканей. На средах без гормонов растут “привыкшие” и опухолевые ткани.

Для получения стеблевого морфогенеза снижают содержание ауксинов. Из ауксинов чаще всего применяют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) - 0.1-10 мг/л, нафтилуксусную кислоту (НУК) - 0.1-2 мг/л, ИУК - 1-30 мг/л.Для индукции каллусогенеза используют более высокие концентрации ауксинов, в дальнейшем ткань может расти при более низком содержании ауксинов.В качестве цитокининов используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), зеатин (0.001-10 мг/л); из них кинетин наименее активен. В состав некоторых сред входит аденин. Иногда используют гибберелловую кислоту (ГК). В качестве рост активаторов применяют также кокосовое молоко, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и др. Состав питательных сред для культивирования биотехнологических объектов зависит от типа их питания:- среда без глюкозы - для хлореллы, цианобактерий;- среда без витаминов и гормонов - для грибов (фузариума, ботритиса) и для ряски (Lemna);

- среда с азотом, сахарами, витаминами и гормонами - для культивирования клеток и тканей высших растений.

Разработано много питательных сред, но большинство из них представляют модификации основных: Мурасиге-Скуга (МС), Уайта, Шенка-Хильдебрандта, Гамборга (В5), Линсмайера-Скуга, Хеллера, Чапека и др. Составы питательных сред, получивших наибольшее распространение приведены в справочниках по физиологии растений и биотехнологии. На сайте вы найдете прописи для базовых сред для культивирования растительных клеток: среда Мурасиге-Скуга и среда Гамборга, некоторые микробиологические среды.

*Последовательность приготовления питательных сред для растительных клеток*

Составление питательной среды начинают с приготовления концентрированных (маточных) растворов. Почему готовят маточные растворы, а не отвешивают соли для приготовления 1 среды? Для удобства - чтобы не взвешивать все необходимые соли всякий раз, когда вздумается завести культуру. С другой стороны, концентрированные растворы менее подвержены опасности быть съеденными микроорганизмами, которая существует даже при хранении разбавленных растворов в холодильнике. Ведь соленые огурцы у вас хранятся гораздо дольше, чем свежие. Вторая причина, по которой мы готовим маточные растворы - снижение погрешности при отмеривании необходимого количества солей. Согласитесь, взвесить 5 граммов проще, чем 50 миллиграммов - во всяком случае мерную емкость, которой потом можно будет отмерить 5, 10 или 20 миллилитров найти проще, чем аналитические весы. Обычно готовят несколько маточных растворов - *макроэлементы, хелатное железо, микроэлементы, хлористый кальций, витамины*, хранят их в отдельных колбах, а при приготовлении среды сливают в той последовательности, в какой они перечислены выше. Делается это для того, чтобы при взаимодействии солей не происходило образование осадка. *Макросоли*взвешивают на технических весах, растворяют по отдельности в небольшом количестве бидистиллята и доводят в цилиндре до объема, в 10 меньшего, чем требуется по прописи среды, т.е. на 1 литр общего объема питательной среды берут 100 мл раствора макросолей. Иногда эта пропорция изменяется, и концентрация увеличивается не в 10 раз, а более, соответственно меняется и объем маточного раствора, который берется для приготовления 1 литра питательной среды. Например, если мы готовим 1 литр (1000 мл) маточного раствора, увеличивая концентрацию солей в нем в 20 раз (масса навески каждой соли \* 20), то для приготовления среды берется 50 мл такого концентрированного раствора (как в случае среды Мурасиге-Скуга). Таким образом, вэтим 1 литре маточного раствора у нас 20 порций по 50 мл для приготовления 20 сред (20\*50=1000). Если концентрация увеличивается в 25 раз, то берется 40 мл и т.д. Навески *микросолей* для хелатного железа растворяют по отдельности, смешивают и доводят до объема с конечной концентрацией 50 мл/л. Раствор должен получится ярко-желтого цвета, рН 8.0. Неправильное приготовление хелатного железа может привести к выпадению в осадок после автоклавирования фосфатов кальция или магния. Навески *микроэлементов* взвешивают на аналитических весах, растворяют так, чтобы конечная концентрация соответствовала 5 мл раствора на 1 литр готовой среды, то есть для приготовления питательной среды мы будем брать по 5 миллилитров. Полученные растворы сливают в склянки с притертыми крышками, снабжают этикеткой и хранят в холодильнике. Железо - хелатный комплекс хранят в темной склянке. *Витамины* готовить несколько сложнее. Самая большая проблема - правильно определить, сколько же граммов или миллиграммов искомого вещества может содержать капсула с витамином. Обычно на коробочке пишут 1%, 5%, 6% раствор тиамин - хлорида, никотиновой кислоты или другого необходимого вам витамина. Это означает, что для его приготовления 1% раствора было взято 1000 миллиграмм вещества, которые растворили в 100 мл воды. Следовательно, каждый миллилитр этого раствора содержит 10 миллиграммов витамина. Стандартная аптечная расфасовка - капсулы по 1 миллилитру. Значит, в каждой капсуле содержится 10 миллиграммов витамина, если это 1% раствор, 50 мг - если 5%. Если вам требуется 10 миллиграммов определенного витамина, а вы имеете в распоряжении капсулу объемом 1 мл, содержащую 50 мг вещества, то что вы сделаете? Правильно - добавите содержимое этой капсулы в мерный цилиндр, доведете объем до 50 мл (лучше всего вытянуть раствор из капсулы шприцем и потом несколько раз промыть дистиллятом и шприц, и капсулу, сливая воду в цилиндр, где вы производите разбавление. И уже разведенного раствора вы возьмете 10 миллилитров. Витамины разливают по 5 мл в пенициллиновые флакончики или пробирки, ставят в морозилку и хранят в замороженном виде. Концентрированные растворы готовят с расчетом добавления 5 мл на 1 литр среды. При составлении среды флакончик с витаминами достают из холодильника, размораживают, опуская в горячую воду, и выливают в колбу с питательной средой. *Фитогормоны* (ауксины и цитокинины) сначала растворяют в 2 мл 96oC этилового спирта (или 0.1 н NaCl) и добавляют 98 мл воды, доводя объем до 100 мл, хранят при температуре 2-4оС. Гиббереллин легко растворим в воде.

Вопросы по теме:

1. Каковы правила организация биотехнологической лаборатории, стерильной работы.

**2.**Что такое ламинарный бокс?

**3.**Как проводят стерилизацию растительного экспланта?

**4.**Какие вы знаете питательные среды?

*Стерильная культура -* культура, свободная от эпифитных и ризосферных микроорганизмов.

Работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной косынкой.

Перед стерилизацией объекта его тщательно моют теплой водой с мылом, промывают дистиллированной водой, очищают от излишних тканей, снимают кожуру у корнеплодов и корней, кору у побегов, поверхностные листья у верхушек побегов, промывают дистиллированной водой и помещают на несколько секунд в 70% спирт (семена на 1-2 минуты). После этого сегменты корней, побегов, стеблей, клубней или семена переносят в стерилизующий раствор.

Вид стерилизующего агента, его концентрация и время действия, зависящие от особенностей тканей исходных растений, необходимо подобрать таким образом, чтобы убить микроорганизмы и не повредить ткани экспланта. Для поверхностной стерилизации растительных объектов применяют следующие средства стерилизации: сулему (двуххлористая ртуть) (0.1%), хлорамин (2-10%), гипохлорит кальция (7-10% Ca(ClO)2) или натрия (NaOCl), перекись водорода (13-18%) и др. Хлорамин можно купить в аптеке. Для стерилизации можно использовать также хлорсодержащие растворы отбеливателей из хозяйственных магазинов, например, средство "Белизна". Свежие растворы отбеливателей при стерилизации нежных эксплантов, таких как молодые листочки, нужно разводить в 2 или даже в 3 раза. Эффективность стерилизации возрастает при добавлении нескольких капель твина-80 и твина-20 на литр стерилизующего раствора.

Продолжительность стерилизации меристем сулемой - 5 минут, семян - 15-20 минут, пергидролем соответственно 15 и 30 минут.

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную воду, выдерживают 10 минут, затем меняют воду ещё два раза, выдерживая в каждой порции по 15-20 минут. В стерильных чашках Петри или на стерильных листах бумаги, или на обожженной кафельной плитке обрезают стерильным скальпелем концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые высаживают на инициальную среду для образования каллусов. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных почек в растворах сулемы или гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизатор не проник в сосуды, что может привести к интоксикации ткани.