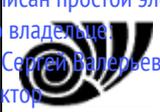


Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 17.09.2025 11:00:50
Уникальный программный ключ:
04c19ed8bfb93bf3b6cb77a486b9a8788b8522523



МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)	стр. 1
Фонд оценочных средств по дисциплине «Конструктивный и энергетический обмен микроорганизмов» по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ»	

Фонд оценочных средств
по дисциплине
Конструктивный и энергетический обмен микроорганизмов

Направление подготовки (специальность)
06.03.01 Биология

Направленность (профили)
Микробиология

Присваиваемая квалификация
Бакалавр

Форма обучения
Очная

Год набора: 2023

Челябинск, 2025

1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: 06.03.01 Биология

Направленность (профиль): Микробиология

Дисциплина: Конструктивный и энергетический обмен микроорганизмов

Семестр изучения: 6

Форма промежуточной аттестации: зачет

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины «Конструктивный и энергетический обмен микроорганизмов» направлено на формирование следующих компетенций:

Код Компетенции(по ФГОС)	Содержание компетенции согласно ФГОС	Коды и содержание компетенций	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
УК- 1	Способен осуществлять поиск, критический анализ и синтез информации, применять системный подход для решения поставленных задач	УК- 1. 2. Использует критический анализ, систематизацию и обобщение информации для решения поставленных задач	Знать: Для достижения УК- 1. 2 знать: правила организации самостоятельной работы по дисциплине Уметь: Для достижения УК- 1. 2 уметь: использовать теоретические знания для решения практических задач Владеть: Для достижения УК- 1. 2 владеть: навыками решения ситуационных задач

ПК- 1	Способен применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов	ПК- 1. 2 Использует теоретические знания в лабораторной работе; ПК- 1. 5 Использует - методы работы с современной аппаратурой и вычислительными средствами; - методы статистической обработки полученных экспериментальных данных	Знать: Для достижения ПК- 1. 2 знать: методы работы с биологическими объектами в лабораторных условиях Уметь: Для достижения ПК- 1. 2 уметь: правильно использовать методы экспериментального исследования Владеть: Для достижения ПК- 1. 5 владеть: навыками проведения лабораторного эксперимента и анализа его данных
-------	---	---	---

3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

3.1. Виды оценочных средств

№ п/п	Код компетенции/ планируемые результаты обучения	Контролируемые разделы (темы) дисциплины	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации/ № задания
1	УК- 1 Для достижения УК- 1. 2 знать: правила организации самостоятельной работы по дисциплине Для достижения УК- 1. 2 уметь: использовать теоретические знания для решения практических задач Для достижения УК- 1. 2 владеть: навыками решения ситуационных задач	1. Конструктивный обмен у микроорганизмов 2. Энергетический обмен у микроорганизмов 3. Регуляция метаболизма микроорганизмов	Контрольная работа, тесты	№1- 23 вопросов к зачету
2	ПК- 1 Для достижения ПК- 1. 2 знать: методы работы с биологическими объектами в лабораторных условиях Уметь: Для достижения ПК- 1. 2 уметь: правильно использовать методы экспериментального исследования Владеть: Для достижения ПК- 1. 5 владеть: навыками проведения лабораторного эксперимента и анализа его данных	1. Конструктивный обмен у микроорганизмов 2. Энергетический обмен у микроорганизмов 3. Регуляция метаболизма микроорганизмов	Контрольная работа, тесты	№1- 23 вопросов к зачету

Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.

3.2 Содержание оценочных средств

Оценочные средства промежуточной аттестации по дисциплине «Конструктивный и энергетический обмен микроорганизмов» представлены перечнем вопросов для зачета.

Вопросы к зачету

1. Особенности обмена белков у микроорганизмов.

Белковый обмен у бактерий — это, с одной стороны, — процесс синтеза и собственных аминокислот белков путем ассимиляции необходимых компонентов из внешней среды, а с другой, — внеклеточное расщепление белков под воздействием различных ферментов. Если расщепление белков происходит в анаэробных условиях, то этот процесс называется **гниение**, а если он идет в аэробных условиях — **тление**.

При наличии у бактерий протеаз белки расщепляются ими до промежуточных продуктов распада — пептонов, а при наличии у бактерий пептидаз пептоны расщепляются ими до аминокислот и продуктов их распада (аммиака, сероводорода, индола). *Протеолитические* (способность расщеплять белки) и *пептолитические* (способность расщеплять пептоны) свойства выражены далеко не у всех бактерий, поэтому их изучение в совокупности с другими ферментативными свойствами помогает идентифицировать бактерии.

2. Особенности обмена углеводов у микроорганизмов.

Углеводный обмен у бактерий также носит двойной характер — это процесс синтеза и распада углеводов. Расщепление углеводов бактериями (сахаролитические свойства) в аэробных условиях с образованием углекислого газа и воды называется **горением**, а расщепление ими углеводов в анаэробных условиях — **брожение**.

В зависимости от характера конечных продуктов разложения углеводов в анаэробных условиях различают брожение:

- спиртовое,
- молочнокислое,
- пропионовокислое,
- муравьинокислое,
- маслянокислое,
- уксуснокислое.

Молекулярный кислород в процессах брожения не участвует. Большинство бактерий, осуществляющих брожение — **облигатные анаэробы**. Однако некоторые из них — **факультативные анаэробы**, способны осуществлять процесс брожения в присутствии кислорода, но без его участия. Более того, этот кислород подавляет процесс брожения. И оно сменяется горением (дыханием — конечный акцептор водорода — кислород). Этот эффект был назван **эффектом Пастера** и является одним из классических примеров смены метаболизма у бактерий в зависимости от условий среды.

3. Особенности обмена липидов у микроорганизмов.

Липидный обмен включает процессы гидролиза липидов, всасывания жирных кислот и моноглицеридов, биосинтеза специфических липидов, их расщепления и выделения конечных продуктов распада.

Большинство видов бактерий усваивают липиды в виде глицерина, который служит источником энергии. Микроорганизмы используют его также для синтеза липидов, которые в виде включений являются резервными питательными веществами (питательным материалом).

Основные процессы липидного обмена осуществляются при помощи липазы и других

липолитических ферментов, прочно связанных с клеточной цитоплазмой.

4. Особенности обмена нуклеиновых кислот у микроорганизмов.

Нуклеиновые кислоты составляют существенную небелковую часть сложного класса органических веществ, получивших название нуклеопротеинов; последние являются основой наследственного аппарата клетки хромосом. Белковые компоненты нуклеопротеинов подвергаются многообразным превращениям, аналогичным метаболизму белков и продуктов их распада – аминокислот, подробно рассмотренному в главе 12. О нуклеиновых кислотах, их структуре и функциях в живых организмах в последнее время накоплен огромный фактический материал, подробно рассмотренный в ряде специальных руководств и монографий. Помимо уникальной роли нуклеиновых кислот в хранении и реализации наследственной информации, промежуточные продукты их обмена, в частности моно-, ди- и трифосфатнуклеозиды, выполняют важные регуляторные функции, контролируя биоэнергетику клетки и скорость метаболических процессов. В то же время нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами и не играют существенной роли в качестве энергетического материала. Далее детально рассматриваются (помимо краткого изложения вопросов переваривания) проблемы метаболизма нуклеиновых кислот и их производных, в частности пути биосинтеза и распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, современные представления о биогенезе ДНК и РНК и их роли в синтезе белка.

Переваривание нуклеопротеинов и всасывание продуктов их распада осуществляются в пищеварительном тракте. Под влиянием ферментов желудка, частично соляной кислоты, нуклеопротеины пищи распадаются на полипептиды и нуклеиновые кислоты;

первые в кишечнике подвергаются гидролитическому расщеплению до свободных аминокислот. Распад нуклеиновых кислот происходит в тонкой кишке в основном гидролитическим путем под действием ДНК- и РНКазы панкреатического сока.

Продуктами реакции при действии РНКазы являются пуриновые и пиримидиновые мононуклеотиды, смесь ди- и тринуклеотидов и резистентные к действию РНКазы олигонуклеотиды. В результате действия ДНКазы образуются в основном динуклеотиды, олигонуклеотиды и небольшое количество мононуклеотидов. Полный гидролиз нуклеиновых кислот до стадии мононуклеотидов осуществляется, очевидно, другими, менее изученными ферментами (фосфоэстеразами) слизистой оболочки кишечника.

В отношении дальнейшей судьбы мононуклеотидов существует два предположения.

Считают, что мононуклеотиды в кишечнике под действием неспецифических фосфатаз (кислой и щелочной), которые гидролизуют фосфоэфирную связь мононуклеотида («нуклеотидазное» действие), расщепляются с образованием нуклеозидов и фосфорной кислоты и в таком виде всасываются. Согласно второму предположению, мононуклеотиды всасываются, а распад их происходит в клетках слизистой оболочки кишечника. Имеются также доказательства существования в стенке кишечника нуклеотидаз, катализирующих гидролитический распад мононуклеотидов.

Дальнейший распад образовавшихся нуклеозидов осуществляется внутри клеток слизистой оболочки преимущественно фосфоли- тическим, а не гидролитическим путем.

Всасываются преимущественно нуклеозиды, и в таком виде часть азотистых оснований может быть использована для синтеза нуклеиновых кислот организмов. Если происходит дальнейший распад нуклеозидов до свободных пуриновых и пиримидиновых оснований, то гуанин не используется для синтетических целей. Другие основания, как показывают опыты с мечеными по азоту аденином и урацилом, в тканях могут включаться в состав нуклеиновых кислот. Однако экспериментальные данные свидетельствуют, что биосинтез азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот органов и тканей, протекает преимущественно, если не целиком, de

ново из низкомолекулярных азотистых и безазотистых предшественников.

Таким образом, синтез нуклеиновых кислот, мономерными единицами которых являются мононуклеотиды, будет определяться скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов; синтез последних в свою очередь зависит от наличия всехсоставляющих из трех компонентов. Источником рибозы и дезоксирибозы служат продукты превращения глюкозы в пентозофосфатном цикле. Пока не получены доказательства существенной роли пищевых пентоз в синтезе нуклеиновых кислот. Фосфорная кислота так же не является лимитирующим фактором, поскольку она поступает в достаточном количестве с пищей. Следовательно, биосинтез нуклеиновых кислот начинается с синтеза азотистых оснований (точнее, мономерных молекул – мононуклеотидов).

5. Энергетические ресурсы для микроорганизмов. Основные пути катаболизма в прокариотической клетке. Окислительно-восстановительные реакции как основа энергетического метаболизма.

Энергетические процессы прокариот по своему объему (массштабности) значительно превосходят процессы биосинтетические, и протекание их приводит к существенным изменениям в окружающей среде. Разнообразны и необычны в этом отношении возможности прокариот, способы их энергетического существования. Все это вместе взятое сосредоточило внимание исследователей в первую очередь на изучении энергетического метаболизма прокариот.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ

Организмы могут использовать не все виды энергии, существующей в природе. Недоступными для них являются ядерная, механическая, тепловая виды энергии. Чтобы теплота могла служить источником энергии, необходим большой перепад температур, который в живых организмах невозможен. Доступными для живых систем внешними источниками энергии (энергетическими ресурсами) являются электромагнитная (физическая) энергия (свет определенной длины волны) и химическая (восстановленные химические соединения). Способностью использовать энергию света обладает большая группа фотосинтезирующих организмов, в том числе и прокариот, имеющих фоторецепторные молекулы нескольких типов (хлорофиллы, каротиноиды, фикобилипротеины). Для всех остальных организмов источниками энергии служат процессы окисления химических соединений.

Часто энергетическими ресурсами служат биополимеры, находящиеся в окружающей среде (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты), а также липиды. Прежде чем быть использованными, биополимеры должны быть гидролизованы до составляющих их мономерных единиц. Этот этап весьма важен по следующим причинам. Белки и нуклеиновые кислоты отличаются исключительным разнообразием. Количество видов белков исчисляется тысячами, после гидролиза же образуется только 20 аминокислот. Все разнообразие нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) после гидролиза сводится к 5 видам нуклеотидов. Таким образом, расщепление полимеров до мономерных единиц резко сокращает набор химических молекул, которые могут быть использованы организмом.

Полимерные молекулы расщепляются до мономеров с помощью ферментов, синтезируемых и выделяемых прокариотами в окружающую среду (экзоферментов).

Крахмал и гликоген гидролизуются амилазами, гликозидные связи целлюлозы расщепляются целлюлазой. Многие бактерии образуют пектиназу, хитиназу, агаразу и другие ферменты, гидролизующие соответствующие полисахариды и их производные.

Белки расщепляются внеклеточными протеазами, действующими на пептидные связи. Нуклеиновые кислоты гидролизуются рибо- и дезоксирибонуклеазами.

Образующиеся небольшие молекулы легко транспортируются в клетку через мембрану.

Процесс распада жирных кислот локализован в клетке и включает несколько этапов. На первом из них жирная кислота с помощью соответствующего фермента превращается в

Ко А- производное, которое окисляется в β -положении с последующим отщеплением ацетил-Ко А. Другим продуктом реакции является Ко А- производное жирной кислоты, укороченное на два углеродных атома. Ацетил-Ко А по катаболическим каналам используется для получения клеткой энергии.

Процесс расщепления биополимеров не связан с образованием свободной, т. е. доступной клетке энергии¹⁹. Происходящее при этом рассеивание энергии так же велико. Образовавшиеся мономеры подвергаются в клетке дальнейшим ферментативным превращениям, которые сводятся к тому, чтобы путем перестройки химической структуры получить молекулы, которые могли бы включиться на каком-либо этапе в качестве метаболитов в функционирующие клеточные катаболические системы. Таких в прокариотной клетке несколько. Основные из них: путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса (гликолиз), окислительный пентозофосфатный путь, путь Энтнера — Дудорова и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Общее для всех катаболических путей — многоступенчатость процесса окисления исходного субстрата. На некоторых этапах окисление субстрата сопряжено с образованием энергии в определенной форме, в которой эта энергия может использоваться в самых разнообразных энергозависимых процессах.

Все химические реакции можно разделить на две большие группы: протекающие без изменения степени окисления и с изменением степени окисления — окислительно-восстановительные.

К окислительно-восстановительным относятся все реакции замещения и те реакции соединения и разложения в которых участвует хотя бы одно простое вещество. Все реакции обмена протекают без изменения степени окисления.

Под степенью окисления понимают фактический заряд атома в молекуле образующийся в результате перераспределения электронной плотности. Она может принимать как отрицательные, так и положительные значения. Степень окисления элемента указывают сверху над символом элемента со знаком «+» или «-» перед цифрой. Например, Mg^{+2} . Вопрос о знаке степени окисления атомов в молекуле решается на основании сопоставления электроотрицательностей связанных между собой атомов, которые образуют молекулу. При этом атом с меньшей электроотрицательностью имеет положительную степень окисления, а с большей электроотрицательностью — отрицательную (т. к. электронная плотность смещена в сторону более электроотрицательного атома).

Степень окисления у молекул простых веществ принято считать равной нулю. В сложных соединениях некоторые элементы имеют одну и ту же степень окисления, но в большинстве случаев степень окисления элемента в различных соединениях различна.

Восстановление - процесс присоединения электронов, приводящий к понижению степени окисления. Вещества, атомы или ионы которых присоединяют электроны называются окислителями. Окислитель, присоединяя электроны, восстанавливается. $Cu^{+2} + 2e \rightarrow Cu^0$.

Общее число электронов, отданных восстановителем, равно числу электронов, принятых окислителем.

При составлении реакций окислительно-восстановительных процессов используют:

- 1) метод электронного баланса
- 2) метод полуреакций или ионно-электронный способ.

Метод электронного баланса является очень простым и наглядным, но имеет ряд не-

достатков:

1) не раскрывает сущности процесса, так как не выделяет истинных участников окислительно-восстановительных реакций (например, в водном растворе не существует ионов Mn^{+7} а есть перманганат-анион MnO_4^-).

2) Не отображает участие среды в окислительно-восстановительной реакции. Эти недостатки устраняет метод полуреакций.

б. Способы получения энергии у прокариот: брожение, дыхание, фотосинтез. Реакции, в которых имеется возможность отрыва электронов, могут быть использованы прокариотами для получения энергии. Разнообразные соединения, способные окисляться, т.е. являющиеся источниками отрываемых электронов, называются **донорами электронов**. Поскольку электроны не могут существовать самостоятельно, они обязательно должны быть перенесены на молекулы, способные их воспринимать и, таким образом, восстанавливаться. Такие молекулы называются **акцепторами электронов**. Донором электронов не может быть предельно окисленное вещество, а их акцептором - предельно восстановленное. Таким образом, должен существовать внешний энергетический ресурс - исходный субстрат. С помощью ферментных систем организм извлекает энергию из этого субстрата в реакциях его ступенчатого окисления, приводящего к освобождению энергии небольшими порциями. У прокариот есть три способа получения АТФ: дыхание, брожение, фотосинтез.

Дыхание. Многие прокариоты окисляют восстановленные вещества с относительно низким окислительно-восстановительным потенциалом (E_0), возникающие в реакциях промежуточного метаболизма или являющиеся исходными субстратами, например НАД⁺, Н₂, сукцинат, лактат, NH₃, H₂S и др.

Окислительно-восстановительный потенциал E_0 характеризует способность определенных веществ быть донорами или акцепторами электронов. Он может быть измерен экспериментально для любой окислительно-восстановительной системы. В соответствии с полученными значениями различные вещества образуют определенную шкалу ОВП, которые принято отсчитывать относительно ОВП реакции: *$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$* . Стандартное значение его при pH 7 (E_0') равно - 420 мВ. Высокая отрицательная величина E_0 водорода говорит о его активной восстановительной способности, т.е. способности отдавать электроны. Чем больше отрицательная величина E_0 определенной окислительно-восстановительной системы, тем выше ее восстановительная способность, и наоборот. E_0 системы *$1/2 O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$* равен +820 мВ. Большая положительная величина потенциала объясняет слабую способность воды отдавать электроны и одновременно высокую способность молекулярного кислорода акцептировать электроны. Таким образом, в соответствии со значениями ОВП для двух или нескольких окислительно-восстановительных систем электроны без подведения энергии извне будут перемещаться в направлении от более электроотрицательных систем к более электроположительным. Окисление происходит в результате переноса электронов через локализованную в мембране **дыхательную электронтранспортную цепь**, состоящую из набора переносчиков, и приводит в большинстве случаев к восстановлению молекулярного кислорода до H₂O. Исходным субстратом для цикла трикарбоновых кислот служит ацетил-КоА, который конденсируется с молекулой щавелевоуксусной кислоты с образованием лимонной и свободного кофермента А. Аналогичные реакции в ЦТК встречаются и у бактерий. У некоторых бактерий цикл не замкнут. Электроны с восстановленных переносчиков (НАД⁺, H₂, НАДФ • H₂, ФАД • H₂), образующихся при функционировании ЦТК или окислительного пентозофосфатного цикла, поступают в **дыхательную цепь**, где проходят через ряд этапов, опускаясь постепенно на все более низкие энергетические уровни, и акцептируются соединениями, служащим конечным акцептором электронов. Перенос электронов приводит к значительному изменению

свободной энергии в системе. В наиболее совершенном виде и единообразии дыхательная цепь предстает у эукариот, где она локализована во внутренней мембране митохондрий. У эубактерий дыхательные цепи поражают разнообразием своей конкретной организации при сохранении принципиального сходства в строении и функционировании. Дыхательные электрон-транспортные цепи состоят из большого числа локализованных в мембране переносчиков, с помощью которых электроны передаются или вместе с протонами, т.е. в виде атомов водорода, или без них. Компонентами цепи, локализованными в мембране, являются переносчики белковой (флавопротеины, FeS-белки, цитохромы) или небелковой (хиноны) природы. Флавопротеины и хиноны осуществляют перенос атомов водорода, а FeS-белки и цитохромы — электронов. НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, катализирующие отрыв водорода от молекул различных субстратов и передающие его на стартовый переносчик дыхательной цепи — НАД(Ф) * H₂-дегидрогеназу, — растворимые ферменты. Дегидрогеназы флавопротеиновой природы, выполняющие аналогичную функцию, могут быть локализованными в мембране (например, сукцинатдегидрогеназа) или существовать в растворимой форме (ацетил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот). Водород с них поступает в дыхательную цепь на уровне хинонов.

Таким образом, в процессе дыхания молекулы одних веществ окисляются, других — восстанавливаются, т.е. окислительно-восстановительные процессы в этом случае всегда межмолекулярны.

Наиболее широко распространена среди прокариот способность окислять **органические субстраты**. Обнаружены так же весьма специализированные группы прокариот, способные окислять различные **неорганические субстраты** (H₂, NH₄⁺, NO₂⁻, H₂S, S₀, S₂O₂-3, Fe²⁺ и др.) с соответствующим восстановлением O₂. Наконец, прокариоты могут окислять органические и неорганические вещества с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а целого ряда органических и неорганических соединений (фумарат, CO₂, NO₃⁻, S₀, SO₂-4, SO₂-3 и др.). Количество освобожденной энергии определяется градиентом окислительно-восстановительных потенциалов при переносе электронов от донора к акцептору. Так, окисление H₂ молекулярным кислородом сопровождается освобождением значительно большего количества свободной энергии (дельта G'° = -238 кДж/моль), чем окисление НАД* H₂ фумаратом (дельта G'° = -68 кДж/моль). Изучение у прокариот электронтранспортных цепей, функционирующих в процессах дыхания и фотосинтеза, выявило принципиальное сходство между ними.

Брожение — наиболее примитивный способ получения энергии, при котором в анаэробных условиях происходит окислительно-восстановительное превращение органических соединений, сопровождающаяся выходом энергии. Двусторонне: окислительная и восстановительная. **Окисление**: отрыв электрона с помощью дегидрогеназ и акцептирование другими молекулами («Анаэробное окисление»). Ведет к выделению энергии, некоторые анаэробы часть энергии получают при расщеплении субстрата, однако при этом выделяется мало энергии. Энергия, получаемая в процессах брожения, дыхания или фотосинтеза, запасается в определенных формах. В процессах брожения в определенных окислительно-восстановительных реакциях образуются нестабильные молекулы, фосфатная группа которых содержит много свободной энергии. Эта группа с помощью соответствующего фермента переносится на молекулу АДФ, что приводит к образованию АТФ. Реакции, в которых энергия, освобождающаяся на определенных окислительных этапах брожения запасается в молекулах АТФ, получили название **субстратного фосфорилирования**. Их особенность заключается в катализировании растворимыми ферментами. Образующийся в восстановительной части окислительно-восстановительных преобразований обратимый субстрат-восстановитель (НАД* H₂, восстановленный ферредоксин) переносит электроны на подходящий эндогенный

акцептор электрона (пируват , ацетальдегид , ацетон и др.) или освобождается в виде газообразного водорода (H_2). Нередко в процессах брожения окислительные и восстановительные преобразования могут происходить **внутримолекулярно**, т. е. одна часть образует молекулы подвергается восстановлению, другая - окислению. В ряде брожений восстановительное и окислительное превращение связано с разными образующимися продуктами брожения, т.е. происходит **межмолекулярно**. К синтезу АТФ ведут **2 типа реакций: Окислительно- восстановительные** (приводит к образованию богатых энергией соединений – ФГА – 1, 3ФГК) и **расщепление субстратов и промежуточных продуктов**. **Проблема акцептора электронов** основная в брожении. При этом акцепторами служат: метаболиты, образ. из исходных субстратов (ПВК, ацетальдегид), вещества из среды культивирования (а.к. и др.), молекулы улекислого газа, ионы водорода, нитрат, сера и др. Восстановленные соединения выделяются в среду и накапливаются там. Типы: гомоферментативное молочнокислое (глюкоза – молочная кислота), спиртовое (глюкоза – этанол), пропионовокислое (пвк – пропионовая кислота), маслянокислое (пвк – масляная кислота).

Фотосинтез – увеличивает свободную энергию на планете. Порфирины – первые фоторецепторы, предшественники хлорофилла. Важный момент – включение металла в центр порфиринового кольца.

У прокариот известны три типа фотосинтеза:

- I - **зависимый от бактериохлорофилла бескислородный** фотосинтез, осуществляемый группами зеленых бактерий, пурпурных бактерий и гелиобактерий;
- II - **зависимый от хлорофилла кислородный** фотосинтез, свойственный цианобактериям и прохлорофитам;
- III - **зависимый от бактериородопсина бескислородный** фотосинтез, найденный у экстремально галофильных археобактерий.

В основе фотосинтеза I и II типа лежит поглощение солнечной энергии различными пигментами, приводящее к разделению электрических зарядов, возникновению восстановителя с низким и окислителя с высоким окислительно- восстановительным потенциалом. Перенос электронов между этими двумя компонентами приводит к выделению свободной энергии. В фотосинтезе III типа окислительно-восстановительные переносчики отсутствуют. В этом случае энергия в доступной для организма форме возникает в результате светозависимого перемещения H^+ через мембрану.

Изучение у прокариот электронтранспортных цепей, функционирующих в процессах дыхания и фотосинтеза I и II типов, выявило принципиальное сходство между ними. В обеих системах электронного транспорта есть флавопротеины, хиноны, цитохромы и белки, содержащие негемовое железо, позволяющие переносить электроны вниз по термодинамической лестнице. Таким образом, по существу обе электронтранспортные цепи являются окислительными. Разнообразие в их организации обнаружено при более детальном изучении и выражается как в широком наборе доноров и акцепторов электронов, так и в конкретной организации самих цепей: химическом строении переносчиков, принадлежащих к одному типу, их наборе, расположении и т.д.

В процессах дыхания и фотосинтеза освобождающаяся при переносе электронов энергия запасается первоначально в форме электрохимического трансмембранного градиента ионов водорода ($\Delta \mu_{H^+}$), т.е. имеет место превращение химической и электромагнитной энергии в электрохимическую. Последняя затем может быть использована для синтеза АТФ. Поскольку в обоих процессах синтез АТФ обязательно связан с мембранами, реакции, приводящие к его образованию, получили название мембранозависимого фосфорилирования. Последнее подразделяется на два вида: окислительное фосфорилирование (АТФ образуется в процессе электронного переноса при окислении химических соединений) и фотосинтетическое фосфорилирование

(синтез АТФ связан с фотосинтетическим электронным транспортом). Следует подчеркнуть, что принципы генерации АТФ при фотосинтезе и дыхании, т. е. механизмы мембранозависимого фосфорилирования, одинаковы.

Бактериохлорофиллы: хлорофиллы эубактерий, 6 видов: а, b, с, d, e, g. Пурпурные: а или b. Зеленые с, d, e, немного а. У облигатно анаэробных фотосинтетических обнаружен g. Цианобактерии: а. Прохлорофиты: а и b. **Фикобилинпротеиды:** красные и синие пигменты, только у цианобактерий. **Каротиноиды:** вспомогательные, поглощают коротковолнового спектра и передают на хлорофилл. Пурпурные, зеленые бактерии.

7. Окисление органических и неорганических соединений. Субстратное и мембранозависимое фосфорилирование.

Окислительное фосфорилирование – это использование энергии, выделяющейся при окислении органических веществ, для синтеза АТФ. Окислительное фосфорилирование бывает 2 типов – субстратное и коферментное.

При субстратном фосфорилировании электроны, отщепленные от данного вещества, затем передаются на это же вещество; однако при этом энергия в молекуле перераспределяется таким образом, что выделяется энергия, идущая на синтез АТФ. Субстратное фосфорилирование идет в ходе гликолиза; в результате субстратного фосфорилирования выделяется мало энергии.

При коферментном фосфорилировании электрон отщепляется от молекулы органического вещества и передается в цепь переносчиков электронов. В процессе передачи электрона от одного переносчика другому он постепенно теряет энергию, и она используется для синтеза АТФ. В итоге электрон передается на кислород. Коферментное фосфорилирование осуществляется на внутренней мембране митохондрий.

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ - это синтез АТФ из аденозиндифосфата и неорганического фосфата, осуществляющийся в живых клетках, благодаря энергии, выделяющейся при окислении органических веществ в процессе клеточного дыхания. **СУБСТРАТНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ** - это синтез АТФ, не связанный с электрон-транспортной системой, при котором остаток фосфорной кислоты (H_2PO_3) переносится на АДФ от высокоэнергетического (фосфорилированного) соединения. Для ряда анаэробов (осуществляющих брожение) является единственным способом получения энергии.

Субстратное фосфорилирование АДФ идет за счет энергии макроэргических связей некоторых соединений (например, метаболитов гликолиза – 1, 3- бисфосфолицерата и фосфоенолпирувата; сукцинил-КоА, креатинфосфата и др.). Этот процесс может происходить как в матриксе митохондрий, так и в цитоплазме клеток независимо от присутствия кислорода. Используется реже, чем окислительное фосфорилирование АДФ.



Окислительное фосфорилирование АДФ – превращение АДФ в АТФ происходит с использованием энергии переноса электронов от органических веществ к кислороду. Энергию для окислительного фосфорилирования поставляют окислительно-восстановительные реакции. Процесс может происходить только в аэробных условиях с участием ферментов цепи переноса электронов (ЦПЭ) и АТФ-синтазы.

Окислительное фосфорилирование АДФ – основной механизм синтеза АТФ в организме. Оно происходит в митохондриях, которые являются основными поставщиками АТФ и могут рассматриваться как “энергетические станции” клетки. Митохондрии

представляют собой небольшие органеллы овальной формы (рис. 5.3), их количество в клетке может достигать 2000. Митохондрии защищены двумя мембранами: наружной и внутренней. Внутренняя мембрана имеет многочисленные глубокие складки (гребневидные выросты), называемые кристами, которые значительно увеличивают ее поверхность.

8. Ингибирование по типу обратной отрицательной связи в разветвленных и неразветвленных метаболических путях. Роль изоферментов. Видоспецифичность такой регуляции.

Когда конечный продукт какого-либо метаболического пути начинает накапливаться, он может действовать как аллостерический ингибитор на фермент, контролирующий первый этап этого пути. Таким образом, продукт, накапливаясь, приостанавливает свое дальнейшее образование. Процесс этот саморегулирующийся: как только продукт будет израсходован, его образование возобновляется. Данное явление — ингибирование конечным продуктом — представляет собой пример механизма, действующего по принципу отрицательной обратной связи.



Ингибирование конечным продуктом. Специфические ферменты, катализирующие отдельные этапы данного метаболического пути, обозначены буквами $e_1 - e_4$.

Кофакторы ферментов. Многим ферментам для эффективной работы требуются те или иные небелковые компоненты, называемые кофакторами. Кофакторы — это вещества, присутствие которых совершенно необходимо для проявления каталитической активности ферментов, хотя сами они в отличие от ферментов сохраняют стабильность при довольно высоких температурах. Роль кофакторов могут играть различные вещества — от простых неорганических ионов до сложных органических молекул; в одних случаях они остаются неизменными в конце реакции, в других — регенерируют в результате того или иного последующего процесса.

Кофакторы подразделяются на три типа: неорганические ионы, простетические группы и коферменты.

9. Аллостерические ферменты и эффекторы. Аллостерическая регуляция центральных метаболических путей.

Аллостерическими ферментами называют ферменты, активность которых регулируется не только количеством молекул субстрата, но и другими веществами, называемыми эффекторами. Участвующие в аллостерической регуляции эффекторы — клеточные метаболиты часто именно того пути, регуляцию которого они осуществляют.

Роль аллостерических ферментов в метаболизме клетки. Аллостерические ферменты играют важную роль в метаболизме, так как они чрезвычайно быстро реагируют на малейшие изменения внутреннего состояния клетки.

Аллостерическая регуляция имеет большое значение в следующих ситуациях:

1. при анаболических процессах. Ингибирование конечным продуктом

метаболического пути и активация начальными метаболитами позволяют осуществлять регуляцию синтеза этих соединений;

2. при катаболических процессах. В случае накопления АТФ в клетке происходит ингибирование метаболических путей, обеспечивающих синтез энергии. Субстраты при этом расходуются на реакции запасания резервных питательных веществ;

3. для координации анаболических и катаболических путей. АТФ и АДФ – аллостерические эффекторы, действующие как антагонисты;

4. для координации параллельно протекающих и взаимосвязанных метаболических путей (например, синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, используемых для синтеза нуклеиновых кислот). Таким образом, конечные продукты одного метаболического пути могут быть аллостерическими эффекторами другого метаболического пути.

Особенности строения и функционирования аллостерических ферментов:

1. обычно это олигомерные белки, состоящие из нескольких протомеров или имеющие доменное строение;

2. они имеют аллостерический центр, пространственно удаленный от каталитического активного центра;

3. эффекторы присоединяются к ферменту нековалентно в аллостерических (регуляторных) центрах;

4. аллостерические центры, так же, как и каталитические, могут проявлять различную специфичность по отношению к лигандам: она может быть абсолютной и групповой.

Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров, одни из которых специфичны к активаторам, другие – к ингибиторам;

1. протомер, на котором находится аллостерический центр, - регуляторный протомер, в отличие от каталитического протомера, содержащего активный центр, в котором проходит химическая реакция;

2. аллостерические ферменты обладают свойством кооперативности: взаимодействие аллостерического эффектора с аллостерическим центром вызывает последовательное кооперативное изменение конформации всех субъединиц, приводящее к изменению конформации активного центра и изменению сродства фермента к субстрату, что снижает или увеличивает каталитическую активность фермента;

3. регуляция аллостерических ферментов обратима: отсоединение эффектора от регуляторной субъединицы восстанавливает исходную каталитическую активность фермента;

4. аллостерические ферменты катализируют ключевые реакции данного метаболического пути.

10. Регуляция активности ферментов путем их ковалентной модификации.

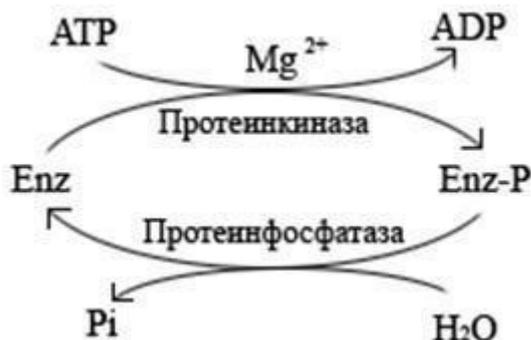
Регуляция активности глутаминсинтетазы путем

аденилирования-деаденилирования. Регуляция активности цитратлиазы путем ацетилирования-деацетилирования.

Ковалентная модификация ферментов – тип регуляции ферментативной активности под действием других ферментов, осуществляющийся за счет присоединения к белковой молекуле небольших химических групп, что вызывает конформационные изменения в молекуле белка, приводящие к изменению определенной геометрии каталитического центра. Является быстрым механизмом регуляции активности ферментов внешними сигналами. Ковалентная модификация является основным механизмом при рецептор-зависимом ответе клеток на внешние воздействия, тогда как аллостерические эффекторы изменяют активность ферментов в ответ на изменение внутриклеточных условий.

Фосфорилирование – наиболее распространенный тип ковалентной модификации, является АТФ-зависимым процессом и осуществляется с помощью ферментов протеинкиназ. В большинстве случаев фосфорилированная форма фермента более

активна, чем не фосфорилированная. Фосфорилирование модифицирует белки добавлением отрицательно заряженных остатков фосфорной кислоты к гидроксильным группам остатков серина, треонина и, реже, тирозина.



Возвращение фермента в исходное состояние осуществляется ферментами протеинфосфатазами, которые отщепляют неорганический фосфат от молекулы белка.

В некоторых случаях фосфорилируемые и дефосфорилируемые белки сами являются модифицируемыми ферментами. Активность протеинкиназ и протеинфосфатаз находится под гормональным контролем и регулируется нервной системой.

К ковалентной модификации ферментов помимо фосфорилирования относятся так же аденилирование, уридилирование, ацетилирование, АДФ-рибозилирование.

Ковалентную модификацию аденилированием и уридилированием можно рассмотреть на примере регуляции активности фермента глутаминсинтетазы. Глутаминсинтетаза выполняет одну из ключевых функций в обмене азота у бактерий *E. Coli*. При выращивании *E. coli* на среде, в которой источником азота служит не NH₄⁺, а другие соединения, в клетках наблюдается высокий уровень глутаминсинтетазной активности. Добавление в ростовую среду солей NH₄⁺ вызывает быстрое (в течение минуты) десятикратное снижение активности фермента, которое нельзя объяснить подавлением его синтеза. Попытки объяснить данное явление привели к открытию фермента, катализирующего инактивацию глутаминсинтетазы *in vitro* в присутствии АТФ Mg²⁺ и глутамина. Далее было установлено, что разные формы фермента содержат различные количества ковалентно связанной АМФ. Далее было установлено, что инактивирующий белок является аденилтрансферазой, катализирующей ковалентное присоединение АМФ к определенной тирозильной группе в каждой из 12 субъединиц глутаминсинтетазы. Однако полное превращение происходит только в экстремальных условиях, например когда клетки, выращенные в условиях недостатка NH₄⁺, попадают в среду, богатую этим соединением. Обычно глутаминсинтетаза находится в промежуточных состояниях аденилирования, в которых аденилированными являются лишь некоторые из 12 субъединиц

11. Регуляция синтеза ферментов на уровне транскрипции. Индукция катаболических ферментов: негативная и позитивная.

Регуляция синтеза ферментов осуществляется путем индукции, репрессии и аттенуации. Индукция синтеза ферментов. Индуцибельный синтез ферментов в клетке идет только до тех пор, пока в среде присутствует индуктор. При этом фермент синтезируется заново одновременно в большинстве клеток культуры. Индукторами синтеза ферментов являются многие субстраты, служащие питательными веществами. К индуцибельным

относится большешинство гидролитических ферментов. Классическим примером индуцибельных ферментов является β -галактозидаза *E. coli*, гидролизующая лактозу на галактозу и глюкозу. При выращивании *E. coli* на среде с лактозой клетки этой бактерии содержат множество молекул β -галактозидазы. При замене лактозы глюкозой в культуре обнаруживаются единичные молекулы этого фермента. Если клетки снова поместить в среду, содержащую только лактозу, то в них происходит интенсивный синтез β -галактозидазы – индуцибельный фермент. Одновременно с β -галактозидазой в клетках *E. coli* синтезируется β -галактозидпермеаза, необходимая для переноса сахара в клетки, и β -галактозидтрансфераза, физиологическая роль которой пока не выяснена. Механизм индукции β -галактозидазы был изучен французскими учеными Ф. Жакобом и Ж. Моно, разработавшим модель оперона. Генетическими элементами модели оперона являются регуляторный ген, оператор, набор структурных генов, промоторный участок. Они локализованы в хромосоме и все вместе, за исключением регуляторного гена, образуют одну функциональную единицу – оперон. Так, лактозный оперон (рис. 7.9) *E. coli* включает три структурных гена – z, y, a, кодирующие синтез трех ферментов – β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и β -галактозидтрансферазы. Рядом расположены ген-оператор (O), который выполняет функцию пускового механизма, контролируя работу структурных генов. По соседству с ним находится промотор (P) для связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Регуляторный ген (R) кодирует синтез репрессора. Репрессор – аллостерический белок, один центр его служит для связывания с оператором, другой – с субстратом-индуктором (в данном примере с аллолактозой, которая образуется из лактозы и является фактическим индуктором β -галактозидазы).



Рис. 7.9. Карта

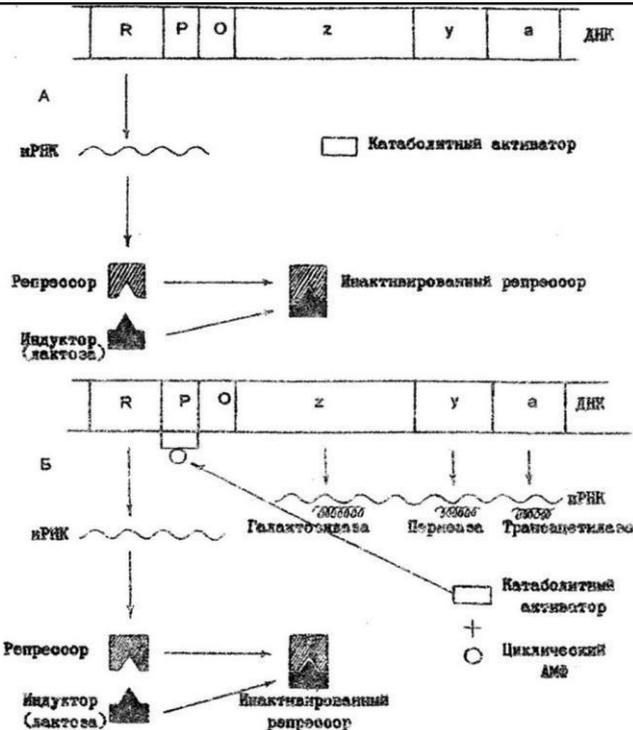
лактозного оперона *E. coli*. При отсутствии в среде лактозы репрессор активен в свободном состоянии и, связываясь с оператором, предотвращает возможность присоединения РНК-полимеразы к промотору и в результате структурные гены не транскрибируются в мРНК и синтез ферментов не происходит. Когда в клетку поступает лактоза, она образует аллолактозу, которая связывается с белком-репрессором. Конформация белка при этом меняется так, что приводит к разрыву связи с оператором. При свободном операторе начинаются транскрипция мРНК и синтез ферментов катаболизма лактозы. Аналогичным путем регулируется синтез и других индуцибельных ферментов.

Катаболитная репрессия. Синтез ферментов регулируется не только путем индукции, но и путем репрессии. Различают два вида репрессии: катаболитную и реессию конечным продуктом. Наличие катаболитной репрессии было установлено при изучении явления диауксии, обнаруженной Моно при анализе роста *Vac. subtilis* на среде, содержащей глюкозу и арабинозу в качестве источника энергии и углерода. Вначале клетки потребляли только глюкозу, а затем по ее исчерпанию – арабинозу. Такое же явление наблюдалось и у *E. coli*: активно усваиваемая глюкоза подавляла потребление других сахаров. Это явление было названо катаболитной репрессией. Сущность ее заключается в том, что легкоусваиваемый клеткой источник энергии подавляет синтез ферментов катаболизма других менее доступных субстратов. Так, на среде, содержащей

глюкозу и лактозу, клетки *E. coli* сначала потребляют глюкозу. Несмотря на наличие в среде индуктора лактозного оперона (лактозы) структурные гены не функционируют и ферменты катаболизма лактозы не синтезируются. Транскрипция генов лактозного оперона начинается при крайне низкой концентрации глюкозы в среде. Изучение механизма катаболической репрессии показало, что она связана с уровнем содержания в клетках циклического АМФ, который необходим для транскрипции лактозного оперона. Циклический АМФ (эффектор) связывается с белковым активатором катаболизма (БАК), или катаболическим активатором, которым является позитивно-регуляторный аллостерический белок, но в отсутствие циклического АМФ он неактивен. Образующийся комплекс (цАМФ + БАК) взаимодействует с участком промоторной области лактозного оперона и обеспечивает присоединение к промотору РНК-полимеразы и инициацию транскрипции (рис. 7.10). Этот тип регуляции получил название позитивной. Катаболическая репрессия функций лактозного оперона глюкозой при наличии в среде лактозы может быть снята при внесении в среду циклического АМФ. Это соединение выполняет только регуляторную функцию. Наличие в клетках глюкозы понижает внутриклеточную концентрацию циклического АМФ. Известно, что содержание его в клетках определяется активностью адеилатциклазы-фермента, катализирующего образование цАМФ из АТФ:



Адеилатциклаза связана с цитоплазматической мембраной и активна в том случае, если компоненты системы транспорта глюкозы в клетку фосфорилированы. Обычно это имеет место тогда, когда в клетке глюкозы нет или низкое содержание и ее надо транспортировать через мембрану. При наличии же глюкозы в достаточном для клетки количестве степень фосфорилирования системы транспорта снижается за счет фосфорилирования молекул поступающей глюкозы и соответственно снижается активность адеилатциклазы. Это приводит к уменьшению количества цАМФ и развитию в клетке катаболической репрессии.



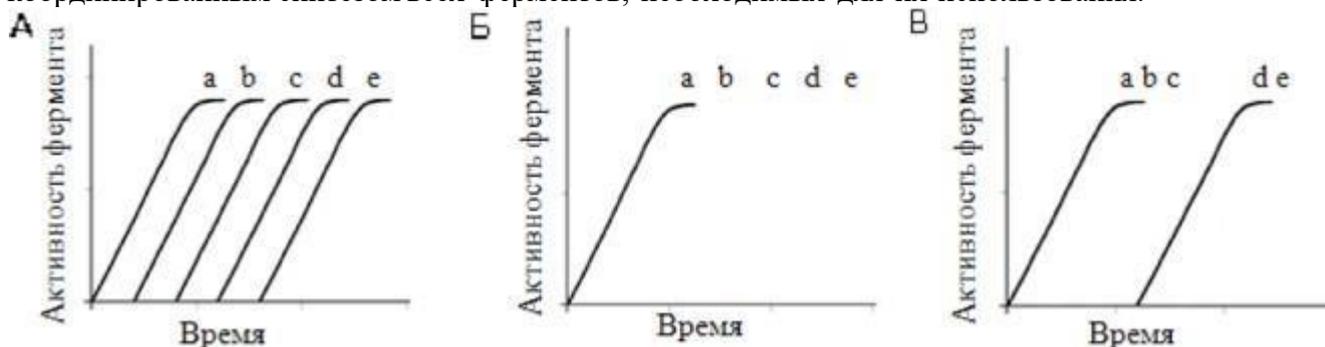
А - ген-регулятор / R/ образует репрессорный белок, связывающийся с оператором / O/ и закрывающий промотор / P/; транскрипция структурных генов / z, y, a/ не происходит; Б - в присутствии индуктора образуется неактивный репрессор, не способный связываться с оператором; промотор открыт, происходит транскрипция. Таким образом, глюкоза сама по себе не вызывает кatabолитную репрессию, а через систему своего транспорта регулирует концентрацию цАМФ. Последний, связываясь с кatabолитным активатором, образует универсальный комплекс, индуцирующий синтез ферментов, находящихся под контролем кatabолитной репрессии. Изучение работы лактозного оперона показало, что регуляция его функций может быть двойной: негативной и позитивной. Негативная регуляция осуществляется на уровне взаимодействия репрессора с индуктором, позитивная - на уровне взаимодействия системы белкового кatabолитного активатора и циклического АМФ с промотором. У триптофанового оперона открыт еще один регуляторный компонент - аттенуатор (от аттенуация - ослабление). Это участок ДНК, который регулирует транскрипцию триптофанового оперона и синтез триптофана. В триптофановом опероне промотор и оператор отделены от структурных генов участком длиной 166 нуклеотидов. Это - лидерная последовательность, которая в свою очередь содержит ослабляющую последовательность, или аттенуатор. Он расположен между 123-150 нуклеотидами. На аттенуаторе около 90 % РНК-полимераз прекращают транскрипцию, не доходя до структурных генов. Это имеет место при высокой концентрации триптофана в клетке. Понижение уровня триптофана приводит к ослаблению действия аттенуатора и РНК-полимера за осуществляет полную транскрипцию оперона. В результате осуществляется синтез ферментов триптофанового пути и образование продукта (триптофана). Отсюда был сделан вывод, что транскрипция триптофанового оперона регулируется участком контролируемой терминции, называемым аттенуатором. Репрессия конечным продуктом. Синтез большинства ферментов анаболизма находится под контролем механизма репрессии конечным продуктом. Сущность его состоит в том, что по мере накопления в клетке конечного продукта биосинтеза снижается скорость синтеза ферментов, катализирующих его образование. Например, если выращивать кишечную палочку на

минимальной среде, то ферменты, участвующие в биосинтезе аргинина, находятся в необходимом для клетки количестве и аргинин синтезируется по мере надобности. Если же в среду внести готовый аргинин (20 мг/л), то синтез ферментов, участвующих в его образовании, прекращается (репрессируется). Изучение механизма репрессии синтеза ферментов конечным продуктом показало, что структурные гены многих ферментов анаболизма организованы в хромосоме также в виде оперона. Когда конечный продукт накапливается в клетках выше нужного уровня, он взаимодействует с белком-репрессором, активируя его. Активированный репрессор присоединяется к операторному участку и блокирует инициацию транскрипции мРНК. Синтез ферментов прекращается. Таким образом, конечный продукт действует как кооператор. При его отсутствии репрессор неактивен. Хотя гены, кодирующие биосинтез ферментов одного метаболического пути, могут быть расположены в разных участках хромосомы, все равно образование данных ферментов регулируется одним конечным продуктом. Так, в клетках кишечной палочки гены, кодирующие ферменты биосинтеза аргинина, локализованы в разных участках хромосомы, но все они репрессируются одним и тем же комплексом — белок-репрессор + аргинин. Более сложной является регуляция синтеза ферментов путем репрессии конечным продуктом в разветвленных путях анаболизма. Как и при регуляции активности, синтез ферментов регулируется так, что каждый конечный продукт может репрессировать образование ферментов только «своего» пути биосинтеза. В разветвленных путях биосинтеза может иметь место и мультиферментная репрессия, аналогичная таковой регуляции активности ферментов.

12. Координированная и последовательная индукция.

При строго последовательной индукции (рисунок 17А) синтез отдельных ферментов может происходить последовательно, или поэтапно, и каждый следующий фермент будет индуцироваться продуктом предшествующей реакции. Когда синтез всех ферментов данной цепи реакций индуцируется координированно, то говорят о полностью координированной индукции (рисунок 17Б). Таким образом субстрат А будет вызывать одновременное образование всего ряда ферментов от а до е. Когда же несколько ферментов, катализирующих ряд начальных реакций (например, а, б, с), индуцируются совместно и индукция синтеза ферментов следующей серии реакций (d, e) происходит продуктом последней из этих реакций (D) или каким-либо другим из них (например, C), то говорят о последовательной индукции координировано регулируемых групп ферментов (рисунок 17В).

Быстрое реагирование на появление в среде того или иного субстрата обеспечивается координированным синтезом всех ферментов, необходимых для их использования.



В нулевое время к клеткам, выросшим в условиях, не вызывавших индукции, добавляли индуцирующий субстрат.

Рисунок 17 - Время появления индуцибельных ферментов при разных типах индукции: А - строго последовательной индукции; Б - полностью координированной индукции; В - последовательной индукции координировано регулируемых групп ферментов. При последовательной же индукции скорость превращения субстрата, а, следовательно, и скорость роста клеток микроорганизмов увеличиваются медленно, что связано с тем, что реакции в клетке должны произойти накопление концентрации продукта до определенного порогового уровня, что приведет к стимуляции образования второго фермента. Целесообразным представляется подразделение ферментов конвергирующих (сходящихся) путей катаболизма при их регуляции синтеза на группы, которые будут совместно (координированно) регулироваться и синтез которых будет в свою очередь индуцироваться продуктом предыдущей группы ферментов. Детальное изучение регуляции синтеза ферментов сходящихся катаболических путей происходило на примерах расщепления триптофана, 4-гидроксibenзойной кислоты и миндальной кислоты клетками *Alcali genes eutrophus Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, при этом схемы регуляции у разных видов оказались различными.

13. Репрессия анаболических ферментов конечным продуктом: позитивная и негативная. Работа рибофлавинового и триптофанового оперонов.

Снижение концентрации фермента в бактериальной клетке может осуществляться путём репрессии синтеза ферментов. Сущность этого механизма регуляции заключается в следующем: когда клетки *E. coli* растут на среде, содержащей в качестве единственного источника азота соль аммония, то им приходится синтезировать все азотсодержащие вещества. Такие клетки, в частности, должны содержать все ферменты, необходимые для синтеза 20 различных аминокислот. Однако если добавить в среду культивирования одну из аминокислот, например триптофан или гистидин, то клетка перестанет вырабатывать весь набор ферментов, необходимых для синтеза этих аминокислот из аммиака и источника углерода. Репрессия синтеза ферментов, катализирующих последовательность реакции метаболического пути конечным продуктом, как это имеет место в случае ферментов синтеза гистидина или триптофана, называется репрессией конечным продуктом.

Это явление теория оперона объясняет следующим образом: при отсутствии в среде Гис или Три регуляторный белок- репрессор не имеет сродства к оператору и происходит синтез ферментов, осуществляющих образование этих аминокислот. Когда в среду добавляют, например, Гис, то эта небольшая молекула, получившая название "**корепрессор**", присоединяется к белку- репрессору. В результате конформационных изменений в молекуле репрессора комплекс белка- репрессора и корепрессора (Гис) приобретает сродство к оператору, присоединяется к нему, и транскрипция оперона прекращается, т. е. прекращается считывание информации о строении 10 ферментов, участвующих в синтезе этой аминокислоты (рис. 4-48).

Следует иметь в виду, что репрессия и индукция синтеза белков у прокариотов реализуют принципы адаптации к меняющимся условиям существования и клеточной экономии: ферменты появляются в клетках, когда в них существует потребность, и перестают вырабатываться, если потребность исчезает.

14. Катаболитная репрессия.

Кроме репрессии конечным продуктом, характерной для анаболических путей, описан тип репрессии, называемой катаболитной и заключающейся в том, что быстро используемые клеткой источники энергии способны подавлять синтез ферментов других

путей катаболизма, участвующих в метаболизировании сравнительно медленно используемых источников энергии.

Катаболическую репрессию можно рассматривать как приспособление клетки к использованию в первую очередь наиболее легко доступных источников энергии. В присутствии такого источника энергии потребление других субстратов, менее "удобных" для клетки, временно приостанавливается, и пути катаболизирования этих субстратов временно выключаются.

Известно, что если в среде для выращивания *E. coli* одновременно содержатся глюкоза и лактоза, сначала используется глюкоза. Несмотря на присутствие индуктора лактозного оперона, ферменты, участвующие в катаболизме лактозы, не синтезируются. Транскрипция генов лактозного оперона начинается, когда концентрация глюкозы в среде становится низкой. Таким образом, глюкоза препятствует синтезу ферментов лактозного оперона.

15. Мультивалентная репрессия.

Даже если генетические возможности микроорганизма позволяют ему продуцировать определенный фермент, при этом еще не гарантируется его синтез (транскрипция и трансляция). Синтез многих ферментов и ферментных систем зависит от присутствия или отсутствия определенных регуляторных компонентов, или триггеров, образующихся эндогенно или вносимых в культуральную среду. Вещества, стимулирующие транскрипцию, называются индукторами, а сам процесс стимуляции называется индукцией. В тех случаях, когда индукторов нет, говорят о деиндукции. Другие вещества, называемые репрессорами, напротив, предотвращают транскрипцию, а сам процесс предотвращения транскрипции называется репрессией в отсутствие репрессора происходит дерепрессия. Описаны различные типы репрессии бактерий: простая репрессия по типу обратной связи, или репрессия конечным продуктом, мультивалентная репрессия, присутствующая определенным ферментом, участвующим в синтезе аминокислот с разветвленной цепью, координированная репрессия, когда все ферменты, участвующие в биосинтезе, согласованно репрессируются в присутствии высоких концентраций продукта реакции (например, триптофана или гистидина). Описанные ниже эксперименты иллюстрируют некоторые типы регуляции синтеза бактериальных ферментов путем индукции и репрессии.

16. Регуляция синтеза ферментов на уровне трансляции: позитивная (дискриминация мРНК) и негативная (трансляционная репрессия).

Регуляция биосинтеза белка - принципиальный атрибут любой живой клетки. Регуляция необходима для поддержания баланса разнообразных белков в клетке или организме, для изменения этого баланса в меняющихся условиях окружающей или внутриорганизменной среды, для обеспечения смены белков в процессах клеточной дифференцировки и развития организма, для адекватного ответа на специфические внешние сигналы или неблагоприятные воздействия. Синтез белков в клетке регулируется на трех уровнях: 1) путем изменения активности генов, то есть через тотальную или избирательную модуляцию продукции мРНК на матрице ДНК (уровень транскрипции); 2) путем изменения активности мРНК в ее трансляции рибосомами (уровень трансляции); 3) путем деградации мРНК посредством ее тотального или избирательного расщепления рибонуклеазами.

Кроме типичной трансляционной репрессии эукариоты выработали интересный механизм маскирования мРНК, когда соответствующая мРНК становится недоступной не только для инициации трансляции, но и фактически выведена из всех других

процессов ее возможных превращений или изменений - деградации нуклеазами, ферментативной модификации ее 3'-конца путем полиаденилирования. Маскирование, как и типичная трансляционная репрессия, тоже осуществляется белками и зависит от внешних сигналов (эффекторов). Маскирование и демаскирование мРНК являются особенно характерными для процессов гаметогенеза (оогенеза и сперматогенеза), раннего эмбрионального развития, клеточной дифференцировки, гормонального включения или включения функций. Например, в оогенезе происходит запасание некоторых материнских мРНК в маскированной форме, и часть этих мРНК демаскируется в ответ на оплодотворение яйцеклетки, обеспечивая белковый синтез на самых ранних стадиях эмбриогенеза: дробления, бластулы и ранней гаструлы.

Наиболее интересным моментом в маскировании мРНК является то, что маскирующий белок связывается не с 5' - проксимальным участком инициации трансляции на мРНК, а с нетранслируемым хвостом мРНК - с 3' - проксимальной некодирующей областью, так называемой 3' - UTR (3'-Un Translated Region) или 3' - НТО (см. [1], рис. 5). В пределах 3' - НТО имеется специальная посадочная площадка для маскирующего белка - сегмент маскирования. Связывание маскирующего белка с сегментом маскирования 3' - НТО приводит не только к блокаде событий, развивающихся при 3' -конце мРНК, таких, как 3' - экзонуклеазная деградация и полиаденилирование, но и к репрессии - блокаде - инициации трансляции при 5' -конце мРНК (рис. 4).

Каким же образом воздействие на хвост мРНК может закрыть ей рот? Существуют два, необязательно взаимоисключающих объяснения этого явления. Первое состоит в допущении, что 5' - и 3' - проксимальные нетранслируемые области (5' - UTR и 3' - UTR) эукариотических мРНК пространственно сближены, образуя своего рода циклическую структуру, как показано на рис. 4. Тогда маскирующий белок, сидящий в 3' - НТО, может прямо или через сегмент маскирования заблокировать участок инициации трансляции мРНК. Другое объяснение предполагает, что связывание маскирующего белка с 3' - НТО приводит к глобальной структурной перестройке всей молекулы мРНК, делающей ее компактной и недоступной для взаимодействий с другими макромолекулами, включая рибосомные частицы, нуклеазы, ферменты полиаденилирования и деаденилирования. Действительно, маскирование требует не только посадки маскирующего белка на 3' - НТО, но и присутствия большого количества менее специфического РНК-связывающего белка на всей мРНК, с которым мРНК образует рибонуклеопротеидные комплексы, в свое время названные информосомами. Можно полагать, что маскирование мРНК есть компактизация информосо

Типичный механизм трансляционной репрессии состоит в том, что специальный белок, называемый репрессором, специфически связывается с участком мРНК, перекрывающимся, как правило, с участком связывания рибосомной частицы при инициации трансляции. Таким образом, связываемый белок-репрессор мешает связываться иницирующей рибосомной частице и тем самым либо уменьшает скорость инициации, либо полностью блокирует ее. Часто в месте связывания белка-репрессора имеется не очень стабильная двуспиральная структура - шпилька, которая легко расплетается иницирующей рибосомой. Белок-репрессор стабилизирует шпильку, превращая ее в плохо преодолимый барьер для иницирующей рибосомы (рис. 3).

В научной литературе описано много случаев, когда репрессором является сам белок, кодируемый данной мРНК. Другими словами, мРНК репрессируется своим же продуктом. В результате получается регуляция по типу обратной связи: производство избыточного количества белка на данной мРНК приводит к связыванию этого белка с инициаторным участком своей мРНК и таким образом к репрессии собственного синтеза. Пример регуляции трансляции по типу обратной связи - репрессия синтеза

фермента треонил- тРНК- синтетазы бактерии избыточным количеством этого фермента, связывающегося с инициаторным участком своей мРНК (подробнее см. [1]).

В других случаях репрессором является специальный белок, и его способность связываться с определенными мРНК зависит от присутствия того или иного низкомолекулярного компонента - эффектора. Яркий пример такого рода приведен в статье Л. П. Овчинникова [1]. Там описано, как в животных клетках белок- репрессор блокирует инициацию синтеза белка ферритина, а железо в качестве эффектора лишает репрессор его мРНК- связывающих свойств и дерепрессирует ферритиновую мРНК, тем самым разрешая ее трансляцию.

В целом механизмы трансляционной репрессии обеспечивают пути модуляции скоростей инициации трансляции в широких пределах либо в зависимости от внешних сигналов (эффекторов), либо по типу обратной связи. Трансляционная репрессия используется для тонкой регуляции белкового синтеза как прокариотическими, так и эукариотическими организмами.

17. Виды трансмембранного переноса у микроорганизмов: пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт.

Липидные бислои в значительной степени непроницаемы для подавляющего большинства веществ, и поэтому перенос через липидную фазу требует значительных энергетических затрат.

Различают пассивный транспорт (диффузию), активный транспорт и везикулярный транспорт.

Пассивный транспорт – это перенос молекул по концентрационному или электрическому градиенту, т. е. он определяется только разностью концентраций переносимого вещества на противоположных сторонах мембраны или направлением электрического поля и осуществляется без затраты энергии АТФ. Возможны два типа диффузии: простая и облегченная.

1. *Простая диффузия*. Происходит без участия мембранного белка. Скорость простой диффузии хорошо описывается обычными законами диффузии для веществ, растворимых в липидном бислое. Скорость движения молекулы определяется концентрационным градиентом и растворимостью молекулы в липидах. Механизм диффузии водорастворимых веществ менее изучен. Перенос веществ через липидный бислой, например, таких соединений, как этанол, возможен и через временные поры в мембране, образованные разрывами в липидном слое при движении мембранных липидов. В мембранах также существуют каналы, образованные белками, через которые могут двигаться молекулы. По механизму простой диффузии осуществляется трансмембранный перенос газов (например, O_2 , CO_2 , N_2 , метан), некоторых простых органических ионов и ряда низкомолекулярных жирорастворимых соединений. Простая диффузия осуществляется не избирательно и отличается низкой скоростью. Транспорт воды через мембрану простой диффузией происходит очень медленно. В тканях, где необходим быстрый перенос воды (почки), вода диффундирует через специфические интегральные белки (аквапорины).

2. *Облегченная диффузия* – движение молекул по градиенту концентрации с использованием специфических мембранных белков-переносчиков. Следовательно, облегченная диффузия – это диффузионный процесс, сопряженный с химической реакцией взаимодействия транспортируемого вещества с белком-переносчиком. Этот процесс специфичен и протекает с более высокой скоростью, чем простая

диффузия. Скорость переноса определяется концентрационным градиентом через мембрану и количеством молекул переносчика.

Известны два типа мембранных транспортных белков: белки-переносчики, называемые *транслоказами* или *пермеазами*, и *каналообразующие* белки.

Для объяснения механизма облегченной диффузии используют модель «пинг-понг». В этой модели, переносчик существует в 2-х конформационных состояниях. В состоянии «понг» белок открыт на стороне высокой концентрации переносимого вещества и связывает это вещество. Затем происходит изменение конформации («пинг») и белок со связанным веществом открывается на сторону с низкой концентрацией переносимого вещества.

Транспортные белки имеют ряд свойств: обладают высокой специфичностью и имеют участки связывания для транспортируемой молекулы; насыщаются при высокой концентрации переносимого вещества; ингибируются конкурентными и неконкурентными ингибиторами.

Облегченная диффузия обычно характерна для водорастворимых веществ: углеводов, аминокислот, метаболитически важных органических кислот, некоторых ионов. Путем облегченной диффузии осуществляется также транспорт стероидных гормонов, ряда жирорастворимых витаминов и других молекул этого класса. Практически направленные потоки веществ в клетку путем простой и облегченной диффузии никогда не прекращаются, поскольку вещества, поступившие в клетку, вовлекаются в метаболические превращения, а их убыль постоянно восполняется путем трансмембранного переноса по градиенту концентрации.

Активный транспорт - транспорт веществ против градиента концентрации (незаряженные частицы) или электрохимического градиента (для заряженных частиц), требующий затрат энергии.

Известны три основных типа первичного активного транспорта:

- 1) Натрий-калиевый насос – Na, K-аденозинтрифосфатаза (Na, K-АТФ-аза) переносит ионы натрия из клетки, а калия – в клетку.
- 2) Кальциевый насос – Ca²⁺-АТФ-аза, который транспортирует Ca²⁺ из клетки или цитозоля в саркоплазматический ретикулум.
- 3) H⁺-АТФ-аза – протонный насос, функционирующий в сопрягающих мембранах, в том числе в митохондриальной мембране.

При нарушении снабжения АТФ активный транспорт останавливается.

Выделяют два вида активного транспорта: 1) *первичный активный* транспорт использует энергию АТФ или окислительно-восстановительного потенциала; 2) *вторично-активный* транспорт используют градиент ионов (H⁺, K⁺, Na⁺, и др.), созданный на мембране за счет работы системы первичного активного транспорта.

Примером первичного активного транспорта является транспорт K⁺ и Na⁺ при участии Na⁺, K⁺-АТФ-азы. Клетка содержит низкую концентрацию Na⁺ (в 10 раз ниже) и высокую концентрацию K⁺ (в 30 раз выше), чем в окружающей среде. Поэтому считают, что Na⁺ это внеклеточный катион, а K⁺ - внутриклеточный катион. Na⁺, K⁺-АТФ-аза обеспечивает выведение 3 ионов Na⁺ из клетки в обмен на введение в клетку двух ионов K⁺ против градиента концентрации с затратой 1 молекулы АТФ. Na⁺, K⁺-АТФ-аза была открыта в 1957 г. Йскоу во фракции плазматических мембран нервов краба. Затем она была обнаружена во всех исследованных клетках животных, особенно велико ее содержание в органах, осуществляющих солевой обмен (почки) или выполняющих электрическую работу (мозг, нервы).

Строение Na⁺, K⁺-АТФ-азы Это тетрамер a₂b₂; м м 270 кДа. Субъединица a (95 кДа) пронизывает мембрану насквозь и содержит на внутренней стороне участка

связывания АТФ и Na^+ , а на внешней стороне - для K^+ и сердечных гликозидов. β -субъединицы (40 кДа) содержат углеводные группы, расположенные на наружной стороне плазматической мембраны. Она способствует правильной ориентации фермента в липидном бислое. Перенос ионов происходит за счет изменения конформации фермента при его фосфорилировании - дефосфорилировании за счет АТФ. В присутствии Na^+ активируется гидролиз АТФ и происходит фосфорилирование фермента, дефосфорилирование происходит в присутствии K^+ .

Транспорт макромолекул (везикулярный транспорт). Крупные макромолекулы (белки, полисахариды и полинуклеотиды) даже крупные частицы могут как поглощаться, так и секретироваться. При их переносе происходит последовательное образование и слияние окруженных мембраной пузырьков (везикул), т.е. перенос веществ вместе с частью плазматической мембраны.

Фагоцитоз (от греч. *фагос* – есть, *цитос* – клетка) наблюдается в специальных клетках (макрофагах и гранулоцитах). При фагоцитозе происходит захват крупных молекул (вирусы, бактерии, клетки). *Пиноцитоз* (от греч. *пинос* – пить) характерен для всех клеток. Происходит захват жидкости или растворенных компонентов. Пиноцитоз бывает неизбирательный и селективный рецепторно-опосредованный. При *эндоцитозе* поглощаемое вещество окружается небольшим участком мембраны, который вначале впячивается, а затем отщепляется, образуя внутриклеточный пузырек, содержащий захваченный клеткой материал. Большинство частиц, поглощаемых при эндоцитозе, попадает затем в лизосомы, где они подвергаются деградации.

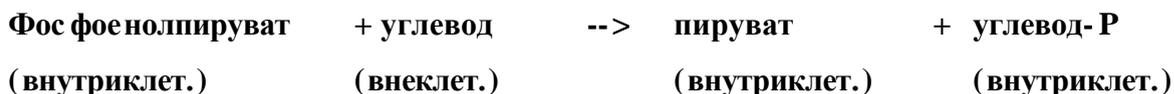
Вещества, высвобождаемые путем экзоцитоза делят на 3 группы: 1) вещества, связывающиеся с клеточной поверхностью как периферические белки – антигены; 2) вещества, включающиеся во внеклеточный матрикс – коллаген, гликозаминогликаны; 3) вещества, входящие во внеклеточную среду, как сигнальные молекулы (инсулин, катехоламины, паратгормон) или ферменты (экзокринные железы, эктоферменты).

18. Перенос радикалов, фосфотрансферазная система. Регуляция активного транспорта.

Транслокация **радикалов** (перенос групп) — против градиента концентрации, с помощью фосфотрансферазной системы, составной частью которой является белок-переносчик, энергозатратна, вещества (преимущественно сахара) поступают в клетку в фосфорилированном виде.

Бактериальная фосфоенолпируват: углевод фосфотрансферазная система (фосфотрансферазная система, ФТС) - это сложная разветвленная сеть переносимых фосфат белков, основной функцией которой является поглощение определенных углеводов из внешней среды. Набор углеводов, поступающих в клетку посредством ФТС, сильно варьирует у разных видов. Механизм работы ФТС заключается в транспорте углеводов через клеточную мембрану, сопряженном с фосфорилированием углевода. Наличие соответствующего углевода в среде и его транспорт внутрь клетки ведут к значительному расходу высокоэнергетического фосфата и, соответственно, снижает концентрацию фосфорилированных промежуточных переносчиков. Эти промежуточные переносчики фосфата взаимодействуют со многими клеточными белками и изменяют их активность. Таким образом наличие или отсутствие определенных углеводов в среде через ФТС влияет на целый ряд важнейших процессов, таких, например, как хемотаксис, индукция катаболических оперонов, метаболизм азота, компетентность и вирулентность. А поскольку некоторые бактерии,

например, *Trepone ma pallidum*, имея все компоненты ФТС, не транспортируют сахара посредством ФТС, регуляторная функция ФТС не менее важна, чем транспортная. Вне зависимости от организма и углевода ФТС катализирует следующий процесс:



Фосфорилирование углевода сопряжено с его транслокацией через мембрану, а необходимая для этого энергия обеспечивается промежуточным продуктом гликолиза - фосфоенилпируватом (ФЕП). Свободная энергия гидролиза фосфатной группы ФЕП - около - 14.7 ккал/ моль (больше, чем у АТФ), а для фосфорилированного сахара - около - 3 ккал/ моль. На первый взгляд, ФТС слишком расточительно расходует энергию. Однако, во-первых, в процессе гликолиза из молекулы ФЕП получается только одна молекула АТФ, а, во-вторых, ФТС обеспечивает одновременно и транспорт, и фосфорилирование своих субстратов (фосфорилирование необходимо для последующего катаболизма субстрата). Для углеводов, транспортируемых не-ФТС системами, на получение фосфорилированного субстрата внутри клетки расходуется более одной молекулы АТФ (как правило, одна на транспорт и одна на фосфорилирование). Это одна из причин, по которой ФТС системы существуют в основном у облигатно и факультативно анаэробных бактерий. Такие бактерии получают АТФ путем субстратного фосфорилирования в анаэробных условиях и, следовательно, должны очень экономно расходовать молекулы АТФ, достигающиеся им с таким трудом.

Регуляция процессов активного транспорта, обеспечивающего поступление подавляющего большинства необходимых прокариотам веществ, происходит на уровне синтеза переносчика и его функционирования. Биосинтез белковых компонентов многих транспортных систем регулируется по типу индукции. Глюкоза, транспортная система которой у большинства прокариот конститутивна, подавляет образование транспортных систем других сахаров и ряда органических кислот путем катаболитной репрессии. Исключение составляют некоторые облигатно аэробные прокариоты, у которых транспорт органических кислот конститутивен, а

индуцируемой является транспортная система глюкозы. Избыток субстрата в среде может репрессировать синтез соответствующей транспортной системы. Это особенно характерно для аминокислот. В этом случае регуляция транспорта координирована с регуляцией их последующего метаболизма. Обнаружена также регуляция транспорта по типу отрицательной обратной связи, когда субстрат

19. Экзоферменты.

- **Экзоферменты**, выделяясь в окружающую среду, расщепляют макромолекулы питательных веществ до более простых соединений, которые могут быть усвоены микробной клеткой. К экзоферментам относятся гидролазы, вызывающие гидролиз белков, жиров, углеводов. В результате гидролиза белки расщепляются на аминокислоты и пептоны, жиры – на жирные кислоты и глицерин, углеводы (полисахариды) – на дисахариды и моносахариды. Расщепление белков вызывают ферменты протеазы, жиров – липазы, углеводов – карбогидразы.

экзофермент или внеклеточный фермент представляет собой фермент, который секретируется клеткой и функционирует вне этой клетки. Экзоферменты продуцируются как прокариотическими, так и эукариотическими клетками, и было показано, что они являются решающим компонентом многих биологических процессов. Чаще всего эти ферменты участвуют в расщеплении более крупных

макромолекул. Разрушение этих более крупных макромолекул имеет решающее значение для обеспечения возможности их составляющим пройти через клеточную мембрану и войти в клетку. Для человека и других сложных организмов этот процесс лучше всего характеризуется пищеварительной системой, которая расщепляет твердую пищу с помощью экзоферментов. Небольшие молекулы, генерируемые активностью экзофермента, проникают в клетки и используются для различных клеточных функций. Бактерии и грибы также продуцируют экзоферменты для переваривания питательных веществ в их окружающей среде, и эти организмы можно использовать для проведения лабораторных анализов для определения присутствия и функции таких экзоферментов. Некоторые патогенные виды также используют экзоферменты в качестве факторов вирулентности, чтобы способствовать распространению этих болезнетворных микроорганизмов. В дополнение к неотъемлемой роли в биологических системах, различные классы микробных экзоферментов использовались людьми с доисторических времен для таких разнообразных целей, как производство продуктов питания, биотопливо, текстильное производство и бумажная промышленность. Другая важная роль, которую выполняют микробные экзоферменты, - это естественная экология и биоремедиация наземных и морских сред.

20. Ферменты патогенности бактерий.

Все обменные процессы в бактериальной клетке идут с участием ферментов (энзимов). Ферменты выполняют функцию биокатализаторов. Они представляются собой простые или сложные белки. Принято различать экзоферменты и эндоферменты. Экзоферменты выделяются микробной клеткой во внешнюю среду. Часть экзоферментов связана с питанием бактерий, так как они расщепляют питательные вещества до такой формы, которая способна усваиваться микробной клеткой. Эндоферменты участвуют в разложении питательных веществ внутри клетки и в превращении их в составные части клетки (рисунок 3).

Рисунок 3 – Действие экзо- и эндоферментов бактерий. Одни ферменты синтезируются бактериальной клеткой постоянно (конститутивные ферменты), другие ферменты синтезируются только при контакте с определенным субстратом (индуцибельные ферменты). В частности, конститутивными ферментами являются ферменты гликолиза – ферменты окисления глюкозы (гексокиназа, глюкозоизомераза, альдолаза и др.). Индуцибельными ферментами являются бета-галактозидаза (катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу) и бета-лактамаза (расщепляет бета-лактамы антибиотиков). Все ферменты подразделяются на шесть классов: - оксидоредуктазы; - трансферазы; - гидролазы; - лиазы; - изомеразы; - лигазы (синтеказы). Оксидоредуктазы – это ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции и встречаются во всех живых клетках. Их основная функция – обеспечение организма энергией в доступной для использования форме. Важнейшими представителями оксидоредуктаз являются дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, гидроксилазы, оксигеназы, каталаза. При идентификации бактерий в основном используют методы выявления каталазы и цитохромоксидазы. Каталаза разлагает пероксид водорода на воду и молекулярный кислород. Этот фермент выявляют по образованию пузырьков кислорода после смешивания микробной суспензии с 1% раствором перекиси водорода на стекле или после нанесения раствора перекиси водорода на культуру, выросшую на поверхности плотной питательной среды.

Цитохромоксидаза окисляет молекулы цитохрома C, восстанавливая кислород. Цитохромоксидазу обнаруживают смачиванием бумаги специальным реактивом

(1% спиртовой раствор α -нафталя; 1% водный раствор N-диметил- β -фенилендиамина дигидрохлорида). Нанесение на бумажку капли суточной культуры бактерий приводит к появлению синего окрашивания. Для этих же целей выпускают также специальные слайды.

Трансферазы – ферменты, которые катализируют перенос отдельных радикалов (PO_3 , H_2 , CH_3), частей молекул или целых атомных группировок от одних соединений к другим. К трансферазам относятся ацетилтрансфераза, фосфотрансфераза, аминотрансфераза, метилтрансфераза. Эти ферменты в повседневной лабораторной практике не определяют. Гидролазы – ферменты, которые катализируют реакции расщепления и синтеза белков, жиров и углеводов с участием воды. К этому классу ферментов относятся пептидогидролазы или протеазы – ферменты, расщепляющие белки; гидролазы гликозидов или гликозидазы, расщепляющие гликозиды (β -фруктофуранозидаза, α -глюкозидаза, β -галактозидаза); эстеразы, катализирующие расщепление сложных эфиров (липаза, фосфатаза). При идентификации бактерий в первую очередь изучают ферменты, расщепляющие углеводы и белки. Способность бактерий расщеплять углеводы, называется сахаролитической активностью, а способность расщеплять белки – протеолитической активностью. Эти признаки выявляются по конечным продуктам расщепления субстратов после посева изучаемой культуры на специальные питательные среды. При ферментации сахаров выявляют образование кислоты (молочной, уксусной, муравьиной) или кислоты и газа (углекислого газа, водорода), а при распаде белков – образование щелочей, сероводорода, индола, аммиака. Для выявления гликозидаз используют жидкие или полужидкие среды Гисса. Жидкие среды Гисса представляют собой пептонную воду, содержащую один из углеводов (лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу и т.д.) и индикатор Андресе (кислый фуксин, обесцвеченный щелочью). Для улавливания образующихся газов в пробирку помещают поплавки (микропробирку вверх дном), который при стерилизации заполняется средой. Исходный цвет среды – соломенно желтый. При расщеплении углевода до кислоты наблюдается только изменение цвета среды на красный, а при образовании еще и газа последний скапливается в поплавке. Если углевод не расщепляется, цвет среды не изменяется.

Протеазы бактерий выявляют при посеве чистой культуры на специальные питательные среды (мясо-пептонный желатин – МПЖ, молочный агар, мясопептонный бульон – МПБ). Результат оценивают по разжижению желатина, разложению казеина молока вокруг колоний или по конечным продуктам распада белков. Разные виды бактерий имеют разную форму разжижения желатина: золотистый стафилококк – в виде воронки, холерный вибрион – в виде гвоздя.

Лиазы – это ферменты, которые катализируют отщепление от субстратов определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп (например, аминогрупп, альдегидных групп) по месту двойных связей без участия воды (декарбоксилазы, дезаминазы). В частности, выявление декарбоксилазы проводится на питательных средах с добавлением соответствующей аминокислоты (например, лизиндекарбоксилазу определяют на среде с лизином). Изомеразы – это ферменты, производящие глубокие внутримолекулярные перестройки, то есть превращение органических соединений в их изомеры (изомеразы, трансферазы, топоизомеразы). В лабораторной практике эти ферменты не выявляют. Лигазы (синтетазы) – это ферменты, которые катализируют синтез сложных органических веществ (сшивание, лигирование) из простых соединений с одновременным разрывом фосфатных связей (аспарагинсинтетаза, кокарбоксилазы).

У патогенных бактерий часть экзоферментов называется ферментами агрессии. Эти экзоферменты способствуют проникновению и распространению бактерий в тканях макроорганизма, а также ослабляют его защитные силы. К ферментам агрессии относятся гиалуронидаза, коллагеназа, лецитиназа, ДНКаза, лейкоцидин, гемолизин, плазмокоагулаза, фибринолизин, нейраминидаза, протеаза и др. В лабораторных условиях определяют такие ферменты патогенности бактерий как гемолизин, лецитиназу, ДНКазу, плазмокоагулазу и фибринолизин. Гемолизин вызывает гемолиз эритроцитов. Присутствие гемолизина можно установить на кровяном агаре по образованию зоны просветления (зоны гемолиза) вокруг колоний. Лецитиназа расщепляет лецитины на фосфохолины и нерастворимые в воде диглицириды. На желточном агаре действие этого фермента проявляется в виде опалесцирующей зоны (радужного венчика) вокруг колоний. ДНКаза катализирует гидролитическое расщепление полинуклеотидной цепи ДНК с образованием отдельных нуклеотидов и олигонуклеотидов. Для выявления ДНКазы используют агар, содержащий водный раствор ДНК и раствор кальция хлорида. После выращивания культуры на чашки наносят раствор соляной кислоты. Положительная реакция проявляется прозрачной зоной деполимеризованной ДНК вокруг колоний на мутном фоне, образованном в результате взаимодействия ДНК с соляной кислотой. Плазмокоагулаза вызывает коагуляцию плазмы крови (образование сгустка). Фибринолизин лизирует фибриновые сгустки. Присутствие плазмокоагулазы и фибринолизина определяется с помощью одного теста. В пробирку с плазмой вносят исследуемую культуру. При наличии плазмокоагулазы через 3-4 часа при комнатной температуре образуется сгусток. При дальнейшем культивировании при температуре 36°C в случае синтеза фибринолизина сгусток разжижается.

21. Уровни регуляции обмена веществ у микроорганизмов.

Для существования и функционирования живых клеток важна не только регуляция активности отдельных путей метаболизма, но и координация деятельности этих путей. Без адекватного контроля происходит дезорганизация метаболизма и, в конечном итоге, гибель клетки. Задача регуляторных механизмов необычайно сложна. Все пути метаболизма должны регулироваться и координироваться так эффективно, чтобы все клеточные компоненты присутствовали в данный момент в точно необходимых количествах. К тому же микробные клетки должны эффективно «отвечать» на изменение окружающей среды использованием имеющихся на данный момент питательных веществ и включением новых катаболических путей, когда другие вещества становятся доступными. Поскольку композиция химических соединений окружающей среды непрерывно меняется, то регуляторные процессы должны постоянно соответствовать новым условиям. Регуляция важна для поддержания баланса между энергодающими и синтетическими реакциями в клетке.

Поток углерода и энергии через тот или иной путь может регулироваться тремя основными способами:

- 1) локализацией метаболитов и ферментов в разных частях клетки;
- 2) стимуляцией или ингибированием активности определенных ферментов, позволяющей быстро менять путь метаболизма;
- 3) контролем количества молекул фермента у микроорганизмов (обычно на уровне транскрипции). Этот способ более медленный, поскольку ферменты синтезируются только тогда, когда в них есть необходимость.

22. Регуляция межклеточных взаимодействий. Программируемая клеточная смерть у бактерий.

Прокариоты синтезируют вещества, регулирующие не внутриклеточный метаболизм, а межклеточные взаимодействия. Особенностями этих веществ, называемых ауторегуляторами, являются выделение их в окружающую среду, проявление биологической активности в очень низкой концентрации (10^{-9} — 10^{-12} М) и воздействие не на организм иного вида, а на другие особи (клетки) того же вида. Эти вещества выделяются клетками прокариот в обычных условиях культивирования и обнаруживают строгую видо- или родоспецифичность.

Как правило, реакция, вызываемая ауторегулятором, связана с жизненным циклом прокариот. Так, стадия формирования плодовых тел в жизненном цикле миксобактерий (см. рис. 21) индуцируется ауторегулятором. Веществом липидной природы, выделяемым вегетативными клетками *Mycobacterium xanthus* выделяются вещества, вызывающие споруляцию этого вида при их концентрации в среде порядка 10^{-10} М. У *Streptococcus faecalis* установлен половой процесс. В клетках-реципиентах синтезируются специфические ауторегуляторы (половые регуляторы, или феромоны), под воздействием которых клетки-доноры приобретают способность прилипать к реципиенту. В результате повышается вероятность образования пары донор—реципиент.

Vibrio fischeri — обычный светящийся симбионт рыб семейства *Monocentridae*. Синтезируемый им ауторегулятор стимулирует образование нескольких компонентов системы свечения. Эффект обнаруживается при концентрации ауторегулятора 10^{-10} М, что соответствует примерно 1–2 молекулам этого соединения на бактериальную клетку. Оптимальная концентрация порядка 200^{-10} М (приблизительно 40 молекул ауторегулятора на клетку).

Несколько видов ауторегуляторов, контролирующих синтез антибиотика и спорообразование, обнаружено у актиномицета *Streptomyces griseus*. Необычное циклическое соединение, индуцирующее образование спор, идентифицировано в клеточных выделениях цианобактерии *Cylinndrospora mlicheniformis*.

Таким образом, прокариотные организмы синтезируют химические вещества-сигналы, регулирующие различные процессы, связанные с межклеточными взаимодействиями в популяции одного вида или даже штамма. Место действия ауторегуляторов —клеточные ферменты. Примечательно, что большинство изученных регуляторов — вещества липидной природы. Это позволяет им легко диффундировать через клеточные мембраны без помощи специальных транспортных систем. Феромоны *S. faecalis* — пептиды, содержащие 8 аминокислотных остатков, единственная гидрофильная аминокислота, входящая в состав этих пептидов, —серин. Гидрофобный характер пептидных феромонов *S. faecalis* также указывает на возможный неспецифический механизм их переноса через клеточные мембраны.

Выявление нового класса веществ — регуляторов жизнедеятельности прокариот на межклеточном уровне — интересно тем, что позволяет рассматривать эти организмы не просто как популяцию разрозненных клеток, но указывает на существование более высокого уровня их организации.

Апоптоз — это один из фундаментальных процессов в жизни клеток организмов, находящихся на самом различном уровне эволюционного развития. Достаточно указать, что основные работы, связанные с генетикой апоптоза были выполнены на круглых червях — нематодах. Установлено, что гены, управляющие апоптозом (стимулирующие апоптоз и тормозящие этот процесс) у нематод и человека мало, чем отличаются друг от друга. Поэтому, физиологические процессы, в обеспечении которых принимает участие апоптоз, сходны для большинства живых организмов. Термин «апоптоз» введен в 1972 году Керром с соавторами для обозначения формы гибели клеток, прототипом которой является гибель тимоцитов под действием

гл юкокортикоидов. Эта форма клеточной смерти была отождествлена с ранее описанной программированной гибелью клеток: разница в обозначениях отражает способы идентификации гибели — морфологический в первом случае и биохимический во втором случае. Морфологический способ определения: Апоптоз — форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Биохимический способ определения: Программированная клеточная гибель — это активная форма клеточной смерти, являющаяся результатом реализации ее генетической программы или ответом на внешние сигналы и требующая затрат энергии и синтеза макромолекул *de novo*. Несмотря на критику — это отождествление, допускающее использование двух терминов как равнозначных, сохраняется до настоящего времени. Программированная гибель клеток привлекает к себе внимание многочисленных исследователей, прежде всего, по двум причинам: Во-первых, как оказалось, она играет важную роль в морфогенетических процессах и в регуляции численности клеток на протяжении всего онтогенетического развития многоклеточного организма. Во-вторых, обнаружено, что возникновение многих тяжелых заболеваний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели, при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что в свою очередь приводит к патологической дегенерации тканей и органов.

Программа апоптотической гибели состоит из следующих основных этапов: 1) индукция, или запуск программы апоптоза; 2) активация проапоптотических белков; 3) каскад каспаз, расщепляющих белки-мишени; 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка; 5) фрагментация клетки на апоптотические тельца; 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками.

23. Микроорганизмы-мутанты с нарушенной регуляцией метаболизма

Мутанты, конститутивно образующие катаболические ферменты. На копительные культуры такого рода мутантов можно получить путем частой сменой субстратов. Если клетки конститутивно образуют ферменты, необходимые для использования субстрата А, то после переноса клеточной популяции с субстрата В на субстрат А они начинают расти с максимальной скоростью; клеткам же индуцибельного дикого типа для достижения максимальной скорости роста необходима определенная лаг-фаза (чтобы синтезировать ферменты для роста на субстрате А). После ряда поколений клеточная популяция переносится на среду с субстратом В и дает им расти до тех пор, пока ферменты, участвующие в использовании субстрата А, не будут достаточно сильно «разбавлены». После многократного повторения такой процедуры конститутивные мутанты сильно обгоняют в росте клетки дикого типа с индуцибельными ферментами. Таким путем были выделены, например, мутанты *E. coli*, конститутивно образующие ферменты, необходимые для использования лактозы. В других методах отбора пользуются таким приемом, как подавление индукции при помощи структурных аналогов субстрата. Метилтиогаляктозид может, например, подавить у *Escherichia coli* индукцию *lac*-оперона, вызываемую галактозой.

Мутанты, конститутивно образующие анаболические ферменты. Эти мутанты, а также мутанты с нарушениями тонкой регуляции процессов биосинтеза могут быть выделены с помощью антиметаболитов. Многие антиметаболиты (разд. 6.6), будучи структурными аналогами нормальных конечных продуктов биосинтеза (аминокислот, пиримидинов и т.п.), оказывают бактериостатическое действие. Имитируя конечный

продукт, они, с одной стороны, нарушают синтез нормальных метаболитов, а с другой - включаются в белки или нуклеиновые кислоты, в результате чего образуются макромолекулы, неспособные выполнять нормальные функции. Ингибирование таким «ложным» конечным продуктом приводит к остановке роста. Если на агаризованную среду с антиметаболитом высеять популяцию дикого типа (10^8 - 10^{10} клеток), то способность к росту и образованию колоний проявят только устойчивые мутанты. В основе подобной **устойчивости к антиметаболитам** могут лежать разнообразные изменения физиологических свойств клетки, обусловленные мутациями. Рассмотрим типы таких мутаций.

- 1. Мутации, приводящие к «аллостерической нечувствительности». При такого рода мутации ни метаболит, ни антиметаболит не может подавить активность первого (аллостерического) фермента данного пути биосинтеза. В результате образование соответствующего конечного продукта не регулируется.
- 2. Мутации, приводящие к конститутивной дерепрессии. Следствие такой мутации - неконтролируемое образование ферментов, участвующих в синтезе конечного продукта.
- 3. Мутации, затрагивающие каталитические центры ферментов, активирующих метаболиты и участвующих в их превращениях. Вследствие повышения избирательности фермент может утратить способность связывать антиметаболит вместо метаболита. После этого антиметаболит уже не будет оказывать бактериостатического действия.
- 4. Мутации, приводящие к нарушению транспортных процессов. В результате таких мутаций антиметаболиты перестают поступать внутрь клетки и потому не могут уже влиять на ее метаболизм.
- 5. Мутации, обуславливающие конститутивное расщепление антиметаболитов. При этом клетка разрушает антиметаболит и тем самым обезвреживает его. С точки зрения отбора мутантов с нарушенной регуляцией интерес представляют только первые два типа мутаций. Дерепрессия синтеза анаболических ферментов и утрата способности подчиняться аллостерическому ингибированию часто приводит к «перепроизводству» и выделению в среду конечного продукта данного биосинтетического пути (метаболита). Для мутантной клетки это существенно потому, что метаболит вытесняет антиметаболит из реакции, обеспечивая таким образом рост клеток и образование колоний. Образующийся в избытке метаболит выделяется, диффундирует в агар и в зоне диффузии устраняет влияние антиметаболита на клетки дикого типа. Такие клетки начинают расти образуют мелкие колонии; их называют ричными или сателлитными колониями. Центральную же колонию образуют клетки мутанта, выделяющего метаболит (рис.

16. 15). Рост сателлитов указывает на то, что произошла мутация, нарушившая нормальную работу регуляторных механизмов. Но для того, чтобы установить, какого рода дефектом обусловлено накопление и выделение метаболита, в каждом случае требуется специальный анализ.

Мутанты с измененной чувствительностью к эффектору. Мутантов, у которых изменена чувствительность какого-нибудь аллостерического фермента к эффектору, можно также выделять с помощью все того же принципа, а именно как ревертантов ауксотрофии. При этом поступают следующим образом. Сначала выделяют мутантов с дефектом регуляции, ауксотрофных в отношении метаболита, который хотят получить как конечный продукт, накапливающийся в среде. Затем среди этих ауксотрофных мутантов отбирают таких, у которых неспособность к синтезу данного метаболита обусловлена дефектом в аллостерическом ферменте

соответствующего пути биосинтеза. После этого из полученной мутантной популяции выделяют прототрофных ревертантов, которые не нуждаются в этом конечном продукте, так как сами способны его синтезировать. Среди ревертантов отбирают тех, которые выделяют нужный продукт в среду. Их можно выявить биоавтографическим методом (разд. 10.2.2) или распознать по росту сателлитных колоний. О таком мутанте, полученном в результате двукратного отбора, можно составить себе следующее представление. У него после первой мутации перестал функционировать каталитический центр одного из аллостерических ферментов. Вторая мутация затронула структуру (конформацию) всей белковой молекулы, в результате чего каталитическая активность фермента восстановилась, но аллостерическая чувствительность оказалась утраченной. Как в этом, так и во многих других случаях для выделения желательного мутанта необходим ряд этапов, включающих мутагенез и отбор.

Теоретические и прикладные аспекты. Стратегия отбора мутантов весьма важна для дальнейшего изучения клеточного метаболизма и для выяснения механизмов регуляции. Вместе с тем эта стратегия имеет и практическое значение, так как именно она определяет пути целенаправленного отбора высокоактивных продуцентов всех веществ, которые могут быть получены с помощью микроорганизмов.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

Критерием успешности освоения учебного материала по окончании учебного семестра (**промежуточная аттестация**) является оценка преподавателем устного ответа при проведении зачета.

4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств

Критерии оценивания теоретического вопроса

Результат	Требования к знаниям
Зачтено	Студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер. Допущенные ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов экзаменатора. Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы, написания тестовых заданий.

Не зачтено	<p>Студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных документов, не умеет обосновать свои суждения; наблюдается нарушение логики изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции.</p> <p>Или, студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи.</p> <p>Участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы и написания тестовых заданий.</p>
-------------------	--

4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

- «1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);
- «2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;
- «3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;
- «4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для *удовлетворительной* (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала.

Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Результат зачета	Требования к знаниям
Зачтено	<p>Студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер. Допущенные ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов экзаменатора.</p> <p>Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы, написания тестовых заданий.</p>
Не зачтено	<p>Студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности и существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных документов, не умеет обосновать свои суждения; нарушается логика изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции.</p> <p>Или, студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи.</p> <p>Учитывается участие в дискуссиях на практических и семинарских занятиях, уровень ответов на контрольные вопросы и написания тестовых заданий.</p>

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины (модуля).

**06.03.01 Направление подготовки Биология, направленность
Микробиология, ФОС РПД Конструктивный и энергитический обмен
микроорганизмов, очная форма обучения
Фонд оценочных средств дисциплины (модуля) одобрен и
рекомендован:**

Проректор по учебной работе утверждено 24.02.2025 А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета

согласовано

Д.С. Сташкевич

Заседанием кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой

согласовано

А. Л. Бурмистрова

Автор (составитель)

Л.И. Бахарева

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ
ВО «ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**