Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана»

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

учебно-методическое пособие
для аспирантов по направлению подготовки

36.06.01 Ветеринария и зоотехния

Казань 2018

УДК 575
ББК 30
Г 14

Печатается по решению Учёного совета факультета биотехнологии и стандартизации ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ (протокол № 5 от 21 мая 2018 г.).

Рецензенты: профессор кафедры технологии животноводства ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ Т.М. Ахметов, заведующая кафедрой ТППМ ФГБОУ ВО КНИТУ профессор Г.О. Ежкова.

.

Гайнуллина, М.К. Биотехнология в животноводстве. Учебно-методическое пособие для аспирантов по направлению подготовки 36.06.01 Ветеринария и зоотехния / М.К. Гайнуллина, О.А. Якимов, А.Н. Волостнова. – Казань: ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2018. – 81 с.

Учебно-методическое пособие разработано в соответствии с требованиями ФГОС ВО и предназначены для аспирантов по направлению подготовки 36.06.01 Ветеринария и зоотехния.

В учебно-методическом пособии представлены теоретический материал по основным вопросам биотехнологии в области животноводства, биотехнологические методы, приемы и средства для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных, методические аспекты дисциплины. Пособие направлено на формирование у аспирантов знаний о роли, значении и рациональном использовании биотехнологии в современном животноводстве и практических навыков работы в лаборатории.

УДК 575

ББК 30

© Гайнуллина, М.К., Якимов О.В., Волостнова А.Н., 2018
© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», 2018

Введение

Бурное развитие биологии, новые представления в области молекулярной биологии и молекулярной генетики в течение последних 25-30 лет привели к развитию биотехнологии. Особенно интенсивно биотехнология стала развиваться с 1981 года. Это направление сформировалось за последние десятилетия и уже сейчас получило мощное развитие.

Биологические технологии (биотехнологии) обеспечивают управляемое получение полезных продуктов для различных сфер человеческой деятельности, базируясь на использовании каталитического потенциала биологических агентов и систем различной степени организации и сложности – микроорганизмов, вирусов, растительных и животных клеток и тканей, а также внеклеточных веществ и компонентов клеток.

Биотехнология решает обширные задачи в различных сферах: исследования и технологии, направленные на создание биотехнологических методов и препаратов для борьбы с вредителями и возбудителями болезней культурных растений и домашних животных, создание биоудобрений, повышение продуктивности растений, в том числе с использованием методов генетической инженерии; производство биотехнологическими методами диагностикумов и лекарственных препаратов с использованием технологий клеточной и генетической инженерии (зеленые вакцины, генные диагностикумы, моноклональные антитела, конструкции и продукты тканевой инженерии и др.); разработка технологий и препаратов для защиты окружающей среды, рекультивации почв, очистки стоков и газовоздушных выбросов, утилизации промышленных отходов и деградации токсикантов с использованием биологических агентов и биологических процессов, а также эффективное использование ресурсов Мирового океана, использование морской биоты для получения пищевых, технических, биологически активных

и лекарственных веществ. Поэтому современная биотехнология - это одно из приоритетных направлений национальной экономики всех развитых стран.

Учебно-методическое пособие по дисциплине «Биотехнология в животноводстве» раскрывает основные направления биотехнологии в области животноводства, на которых базируются ее современные аспекты и особенности их использования в профессиональной деятельности. Курс нацелен на формирование у аспирантов знаний, умений и навыков выбора биотехнологических методов, приемов и средств организации и ведения животноводческого производства с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и получения экологически безопасной животноводческой продукции.

РАЗДЕЛ I. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

ТЕМА 1. Правила работы в лаборатории. Подготовка посуды, питательных сред для микробного синтеза

Методические указания

Правила работы в лаборатории с микроорганизмами

В лаборатории при работе с микроорганизмами строго соблюдают ряд предосторожностей и поддерживают определенный режим. Работают в белых халатах, шапочках или косынках. На рабочем месте не должно быть лишних предметов. Все принадлежности располагаются на определенных местах. Пробирки и колбы с культурами микроорганизмами должны иметь четкие надписи чернилами по стеклу, емкости с реактивами и растворами – этикетки.

Лабораторию содержат в чистоте и ежедневно проводят гигиеническую уборку лабораторных помещений. В микробиологической практике для уничтожения микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях применяют разнообразные способы дезинфекции. Помещение лаборатории необходимо часто проветривать. Продолжительность проветривания должна быть не менее 30-60 минут. Вентиляция резко снижает количество микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице температур снаружи и внутри помещения.

Наиболее эффективный способ дезинфекции воздуха – облучение ультрафиолетовыми лучами, обладающими высоким антимикробным действием и вызывающими гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов. Из-за слабой проникающей способности ультрафиолетовые лучи не проходят через обычное стекло. УФ-излучениепоглощается частицами пыли, а некоторые материалы, например белая бумага, заметно отражают УФ-лучи, поэтому для стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов, в зависимости от степени загрязненности воздуха. Бактерицидные лампы

устанавливают на высоте 2-2,5 метров от поверхности пола и с таким расчетом, чтобы на 7-8 $м^3$ помещения приходилась одна лампа. При работе с бактерицидными лампами пользуются темными или простыми защитными очками. Следует помнить, что УФ-лучи вызывают острое воспаление роговицы глаз с характерными слезоточением и светобоязнью, наступающими вскоре после облучения. Поэтому необходимо следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза. В небольших помещениях находиться при включенной бактерицидной лампе нельзя.

Пол, стены и мебель в лаборатории протирают раствором различных дезинфицирующих веществ: 2-3 % раствором соды (двууглекислого натрия), 3-5 % раствором фенола или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5-3 % раствором хлорамина, 0,3-0,4 % растворами четвертичных аммонийных соединений. Применение многих дезинфицирующих средств ограничивается их высокими коррозионными свойствами и токсичностью. Чаще используют 3-5 % раствор фенола или 0,5-3 % водный раствор хлорамина. Особенно тщательно до и после работы нужно дезинфицировать поверхность стола, на котором проводилась работа с микроорганизмами. Микробная масса не должна загрязнять руки, стол и окружающие предметы. Если же произошло загрязнение поверхности предметов, то ее следует протирать дезинфицирующим раствором (3 % раствором хлорамина, 70 % этанолом). Иглы, петли, пинцеты после каждого соприкосновения с микроорганизмами прожигают в пламени горелки и ставят в специальный штатив. Пролившуюся микробную взвесь обезвреживают, используя дезинфицирующие средства (70 % этанол или раствор хлорамина).

По окончании работы загрязненную микроорганизмами посуду стерилизуют кипячением или автоклавированием, чтобы уничтожить живые клетки, и только после этого ее можно мыть. Поверхность плотных питательных сред заливают дезинфицирующим раствором. Через сутки среды можно выбрасывать и мыть посуду. Использованные пипетки помещают в 3 % раствор хлорамина, после выдержки их моют и стерилизуют. Предметные и

покровные стекла после работы помещают в дезинфицирующий раствор, затем тщательно моют и проточной воде. Посуду моют только в резиновых перчатках. Неаккуратное обращение с микроорганизмами может привести к образованию в воздухе микробного аэрозоля.

При работе со спиртовками нужно остерегаться воспламенения паров спирта. Нельзя зажигать спиртовку от другой горящей спиртовки. Гасят пламя спиртовки только специальными колпачками. При воспламенении ватных пробок, для предупреждения доступа воздуха, их вводят в пробирки, колбы или накрывают сверху полотенцем. Обращение с аппаратами, работающими под давлением, напряжением или при высокой температуре, требует строгого соблюдения правил техники безопасности.

В лаборатории не разрешается курить, есть, пить, много ходить, вносить в нее посторонние предметы, находиться в верхней одежде и в головных уборах. Категорически запрещается выносить микробные культуры за пределы лабораторного помещения. Следует строго соблюдать правила личной гигиены – тщательно дезинфицировать и мыть руки с мылом после окончания работы.

В специальном журнале студенты и сотрудники делают запись о проведении инструктажа и ознакомлении с режимом работы в лаборатории.

Характеристика питательных сред

Для осуществления питания и размножения микроорганизмам необходимы определенные условия и, в первую очередь, наличие питательных веществ. Поскольку в лабораторных условиях микроорганизмы культивируются на питательных средах, они должна содержать все вещества, необходимые для их роста. Конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов разнообразны, поэтому разнообразны и их потребности в питательных веществах. Из этого следует, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среда для культивирования микроорганизмов являются соединения углерода и азота,

именно эти соединения определяют специфичность большинства питательных сред. Помимо источников углерода и азота многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста, к которым относятся витамины, аминокислоты и азотистые основания. Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить дрожжевой автолизат, дрожжевой и кукурузный экстракты. Для построения веществ клетки микроорганизмам необходимы также сера, фосфор, калий, натрий, железо и другие элементы. Потребности микроорганизмов в этих элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей.

Питательные среды должны быть сбалансированы по составу, иметь оптимальные влажность, вязкость, реакцию среды (pH), окислительно-восстановительный потенциал.

В зависимости от состава и назначения питательные среды для культивирования микроорганизмов принято классифицировать.

По составу среды на две группы:

1. Натуральные (естественные) неопределенного состава – природные, комплексные, органические среды неизвестного или неопределенного состава. Включают различные вещества растительного и животного происхождения. К ним относятся пептоны, кровь, экстракты, сусло, молоко, сыворотка, картофель и др.

2. Синтетические среды готовят из точно определенных количеств органических и неорганических химический соединений известного состава и воды. Преимущество таких сред заключается в постоянном составе и воспроизводимости. В настоящее время микробиологи располагают синтетическими средами, не уступающими по своему составу натуральным.

По назначению различают:

1. Элективные среды, обеспечивающие преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем не пригодны для развития других. Эти среды применяют для выделения

микроорганизмов из мест их естественного обитания или для получения накопительных культур.

2. *Дифференциально-диагностические среды* – это сложные среды, на которых микроорганизмы разных видов растут по-разному, в зависимости от биохимических свойств культуры.

3. Индикаторные среды позволяют достаточно быстро отличить один вид микроорганизмов от других. Эти среды применяются в клинической бактериологии, при генетических исследованиях, а также для идентификации микроорганизмов.

4. Универсальные (основные или стандартные) - это среды благоприятные для выращивания многих видов микроорганизмов: мясопептонный бульон, неохмеленное пивное сусло и другие.

По консистенции различают:

1. Жидкие среды, которые применяются для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена.

2. Плотные среды - для выделения чистых культур (получения изолированных колоний), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов и т.д.

3. Сыпучие среды (разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором) - в микробиологической промышленности.

Приготовление питательных сред. Для приготовления питательных сред применяют чистую посуду, не содержащую посторонних веществ. Лучше пользоваться стеклянной посудой (колбы, флаконы, стаканы, матрацы, пробирки и другие). Новую стеклянную посуду моют и погружают на 8-10 ч в 1-2 % раствор соляной или серной кислоты или кипятят в подкисленной воде, затем тщательно прополаскивают дистиллированной водой и сушат. Бывшую в работе посуду моют ершами или щетками в теплой воде, применяя кальцинированную соду, мыльный раствор,

полужидкое мыло или синтетические моющие средства, прополаскивают сначала проточной водопроводной, затем дистиллированной водой. Очень загрязненную посуду со следами жира обрабатывают хромовой смесью и тщательно промывают водой. Сушат посуду при комнатной температуре или в сушильном шкафу, закрывают ватными пробками с бумажными колпачками и хранят в защищенном от пыли месте.

Жидкие питательные среды фильтруют через бумажный или полотняный фильтр и разливают в пробирки при помощи воронок с короткой резиновой трубкой, зажимом Мора и стеклянным наконечником. Для уплотнения жидких сред в них вносят необходимое количество агара и нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения. Расплавленные агаризованные среды фильтруют через ватно-марлевые фильтры и разливают через металлические двустенные воронки для горячего фильтрования. Для получения скошенного агара пробирки заполняют на 1/2 их высоты, для залива чашек – на 2/3 (лучше использовать пробирки большего объема), после чего стерилизуют. Можно, не разливая по пробиркам, стерилизовать среду в колбах. Пробирки и колбы перед стерилизацией закрывают ватными пробками. После стерилизации пробирки для скошенного агара устанавливают в наклонном положении и оставляют для застывания. Среда не должна доходить до ватной пробки на 5-6 см.

Хранят стерильные питательные среды в прохладном, умеренно сухом помещении, в плотно закрытых шкафах, защищающих от действия света и высыхания. В сырых помещениях ватные пробки впитывают влагу, что приводит к развитию мицелиальных грибов, которые впоследствии могут попасть внутрь колб и пробирок. Каждую колбу со средой снабжают этикеткой с обозначением ее состава (или названия) и датой приготовления.

Практическая работа № 1

Характеристика и приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов

Цель работы:Ознакомиться с основными питательными средами для культивирования микроорганизмов и методами их приготовления.

Задачи работы:

1. Ознакомиться с характеристикой питательных сред по разным признакам.

2. Охарактеризовать питательную среду (по выбору преподавателя) и выявить в ней компоненты, служащие источником углерода и азота, факторами роста, источниками минеральных веществ и пр.

Ход работы

Выбрать питательную среду (по указанию преподавателя). Привести характеристику выбранной питательной среды по составу и назначению. Определить компоненты среды, являющиеся источниками углерода и азота, минеральных веществ, факторов роста и пр.

Таблица 1 – Примеры питательных сред

№ варианта	Состав компонентов питательной среды
Среда 1	Меласса, кукурузный экстракт, хлорид аммония
Среда 2	Глюкоза, лизин, сульфат магния, фосфат калия, сульфат железа, вода
Среда 3	Ацетат натрия, хлорид аммония, глюкоза, дрожжевой автолизат, агар, вода
Среда 4	Пептон, гидрофосфат калия, агар, глюкоза, эозин, метиленовый синий, вода
Среда 5	Раствор сахарозы с винной кислотой
Среда 6	Сусло с винной кислотой
Среда 7	Водныйагар и обезжиренное молоко
Среда 8	Мальтоза, пептон, агар, вода
Среда 9	Дрожжевая вода, хлорид натрия, сахароза, агар
Среда 10	Вода, пептон из казеина, мясной экстракт, дрожжевой экстракт, глюкоза, фосфат калия, ацетат натрия, сульфат магния, твин-80, агар

Среда 11	Пептонная вода, раствор бромтимоловогосинего
Среда 12	Вода, глюкоза, сульфат магния, дигидрофосфат калия, лактаткалия, лизин, витаминный раствор
Среда 13	Вода, ацетат натрия, хлорид аммония, глюкоза, дрожжевой автолизат
Среда 14	Вода, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия, сульфат магния, хлорид кальция, агар
Среда 15	Меласса, диаммоний фосфат, вода
Среда 16	Вода, сахароза, дигидрофосфат калия, нитрат натрия, сульфат магния, хлорид калия, сульфат железа, агар
Среда 17	Вода, сахароза, нитрат аммония, дигидрофосфат, сульфат магния, сульфат железа, агар
Среда 18	Молоко, картофельная мука, пептон, яичный белок, водный раствор малахитовой зелени
Среда 19	Мясная вода, пептон, поваренная соль, агар
Среда 20	Мясопептонная вода, желатин

Контрольные вопросы

1. Требования, предъявляемые к составу питательных сред.
2. Основные компоненты питательных сред и их назначение.
3. Классификация питательных сред по составу.
4. Классификация питательных сред по назначению.
5. Классификация питательных сред по консистенции.
6. Основные этапы приготовления питательных сред

ТЕМА 2. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА ГИБЕЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРОДУКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Методические указания

Ряд биотехнологических производств и отдельные стадии получения продукции с использованием биотехнологических приемов требуют обеспечения асептических условий.

Под **асептическими условиями** понимают мероприятия, препятствующие попаданию контаминантов.

Термином «*контаминанты*» обозначают постороннюю микрофлору, микроорганизмы-загрязнители.

Под поддержанием и созданием асептических условий в технологии следует понимать:

• обеспечение условий получения чистых культур в лаборатории и специализированных отделениях в растильных аппаратах, камерах;

• стерилизация, герметизация оборудования и коммуникаций;

• специальные приемы при введении добавок, посев, отбор проб;

• стерилизация пеногасителей, питательных сред, воздуха.

Под ***стерилизацией*** понимают полное освобождение любого материального потока, а также оборудования и коммуникации от жизнеспособных микроорганизмов, их спор.

Процессы, использование на практике которых, способствует достижению и поддержанию асептических условий, условно можно разделить на две группы: процессы, уничтожающие постороннюю микрофлору; процессы, удаляющие микроорганизмы из материального потока (рисунок 1).

При выборе метода стерилизации следует учитывать чувствительность микроорганизмов к применяемым факторам, а также их численность, видовую принадлежность, содержание в них влаги, физиологическую форму (вегетативная, споры), возраст клеток спор, значение pH, химический состав, физические свойства среды и ее объем.

Гибель микроорганизмов при стерилизации обусловлена повреждением биологически важных макромолекул клетки и, как следствие, нарушение определенных физиологических функций. Так, отмирание клеток при термообработке во влажной среде наступает из-за денатурации белков, и освобождения нуклеиновых кислот, инактивации ферментов, повреждения цитоплазматической мембраны. При воздействии на клетки сухого жара гибель происходит в результате активных окислительных процессов и нарушения клеточных структур.

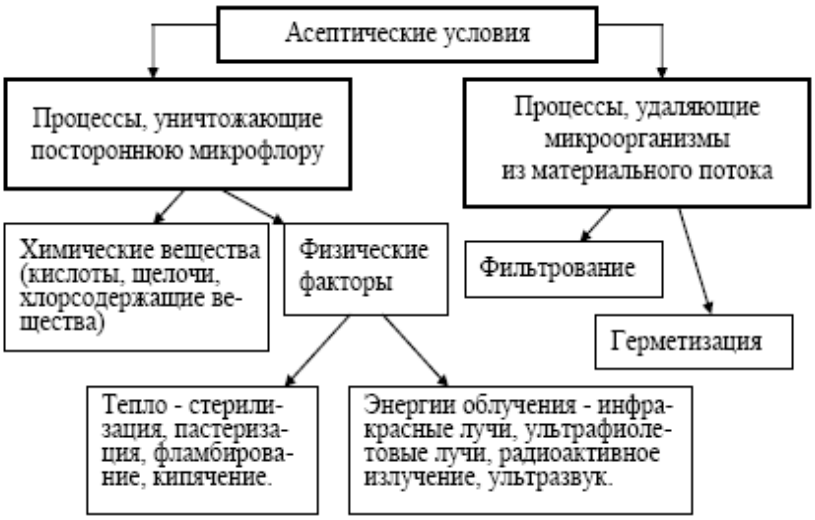


Рисунок 1 – Процессы создания асептических условий

В пищевых производствах на губительном действии высоких температур основаны многие приемы по уничтожению микроорганизмов в пищевых продуктах и других объектах, путем кипячения, варки, обжарки, пропаривания, бланширования, пастеризации, стерилизации.

Пастеризация – это нагревание материала при температуре ниже 100 °С в течение 20 - 40 мин. При пастеризации погибают не все микроорганизмы, так некоторые термоустойчивые бактерии, а также споры остаются живыми. Поэтому пастеризованные продукты следует немедленно охлаждать до 4 - 8 °С и хранить в холоде, чтобы задержать прорастание спор и развитие сохранившихся клеток. Пастеризации подвергают молоко, пиво, вино, икру, фруктовые соки.

Стерилизация – это термическая обработка при температурах выше 100 °С, в результате которой гибнут и вегетативные клетки и их споры. Стерилизуют баночные консервы, многие предметы и материалы в медицинской практике, питательные среды и оборудование в биотехнологическом производстве.

Воздействие на микроорганизмы различных форм **лучистой энергии**, представляющих собой электромагнитные колебания различной длины волн, проявляется по-разному и зависит от длины волны, дозы облучения. При

облучении наиболее угнетаемым в клетке процессаом является окислительноефосфорилирование, изменяются физико-химические свойства нуклеопротеидов, происходят изменения в ДНК, нарушаются транскрипция, трансляция, функции мембран, угнетаются энергетические процессы. Возможны все виды мутаций: геномные – кратные изменения гаплоидного числа хромосом; хромосомные – структурные или численные изменения хромосом; генные или точковые – изменение молекулярной структуры генов, в результате синтезируются белки, утратившие свою биологическую активность.

Среди химических веществ можно выделить антисептики – вещества, губительно действующие на микроорганизмы (бактерицидные, фунгицидные) и задерживающие развитие (бактериостатические, фунгистатические). Эффективность действия антисептиков зависит от природы вещества, концентрации, биологических особенностей микроорганизмов, продолжительности воздействия, температуры, pH и состава среды. Более чувствительны к антисептикам вегетативные клетки, чем споры.

Из **неорганических соединений** сильнодействующими являются соли тяжелых металлов. Бактерицидное действие проявляют окислители Cl_2, I_2, H_2O_2, $KMnO_4$, H_2SO_4, HCl, H_2S, CO_2, SO_2.

Из **органических соединений** токсичны для микроорганизмов фенолы, альдегиды, спирты, органические кислоты (салициловая, уксусная, бензойная, сорбиновая), эфирные масла, смолы, красители (генцианвиолет, фуксин, бриллиантовая зелень).

Механизм действия антисептиков различен:

• повреждение клеточной стенки и нарушение мембраны;

• нарушение обмена веществ в результате взаимодействия с компонентами клетки после проникновения в нее;

• воздействие на белки, ферменты;

• растворение липидов клеточных мембран;

• изменение pH среды.

Химические вещества используют для дезинфекции воды, тары, оборудования, инвентаря, как консерванты готовой продукции, сырья. Применение антисептиков ограничено и строго нормируется по дозе, цели обработки, назначению продукции.

Практическая работа № 2

Влияние разных режимов стерилизации на гибель микроорганизмов

Цель работы:Оценить эффективность термической и химической стерилизации на микроорганизмы.

Задачи работы:

1. Подвергнуть суспензию микроорганизмов термической и химической обработке.

2. Для каждого температурного режима и концентрации химического вещества рассчитать величину критерия стерилизации Δ и построить график зависимости от температуры и продолжительности обработки: Δ =*f* (*t* °C), Δ = *f* (τ, мин);

3. По полученным результатам сделать развернутое заключение о характере влияния стерилизующего фактора, механизме его действия на клетки микроорганизмов, условиях эффективного воздействия этого фактора и области его использования в пищевой биотехнологии.

Ход работы

1. Готовим суспензию хлебопекарных дрожжей *Saccharomycescerevisiae* и разливаем по пробиркам.

2. Пробирки с микробной суспензией выдерживаем при различных температурных режимах (65 °С, 85 °С, 100 °С). Через определенные интервалы времени (15 мин) в течение часа отбираем пробы и определяем количество

живых клеток с помощью камеры Горяева после предварительной обработки микробной суспензии метиленовым синим. Живые клетки остаются прозрачными, а мертвые - окрашены в голубой или синий цвет.

3. Микробную суспензию обрабатываем различными концентрациями этанола (5%, 10%, 30%, 50% к объему среды). Через определенные интервалы времени отбираем пробы (15 мин) в течение часа и определяем количество живых клеток с помощью камеры Горяева.

Подсчет клеток микроорганизмов в камере Горяева-Тома

Счетная камера Горяева-Тома представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками на части. Центральная часть стекла ниже боковых на 0.1 мм (глубина камеры) и на ней нанесена сетка (рисунок 2). Площадь большого квадрата равна 1/25 мм^2, площадь малого – 1/ 400 мм^2.

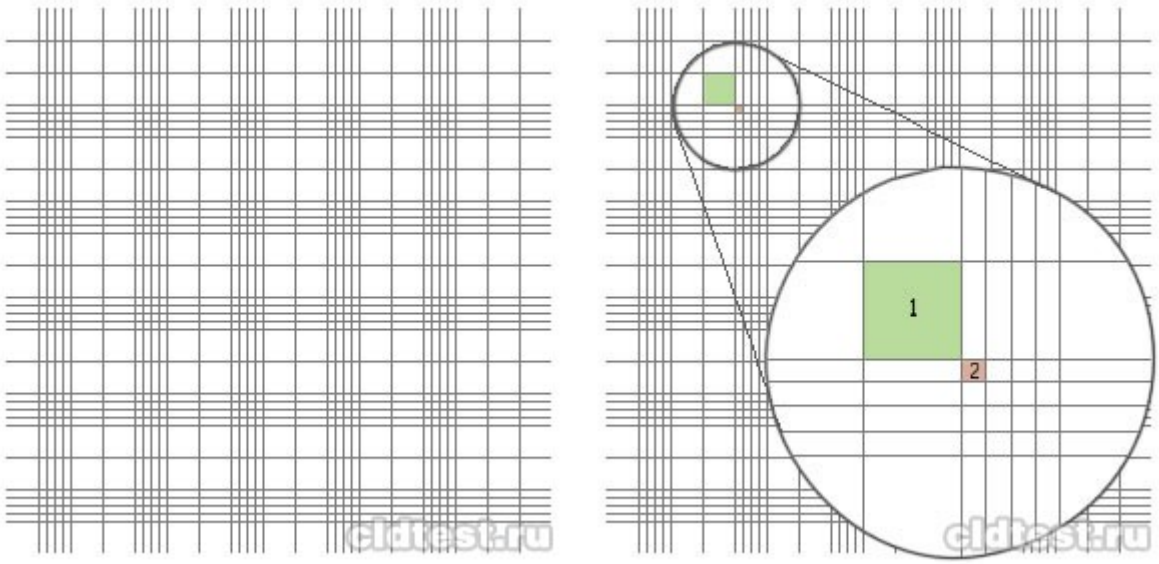


Рисунок 2 – Сетка камеры Горяева-Тома

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Эти кольца указывают на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем взвеси микроорганизмов, находящийся в камере,

соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензию вносят через бороздку камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 3 - 5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости. Число клеток подсчитывают с объективом 8х или 40х. Обычно подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600. Подсчет клеток повторяют 3 - 4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой взвесью микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры.

4. Вычислить число живых клеток в 1 мл суспензии по формуле (1):

$$M = a \cdot 1000 \cdot n / h \cdot S, \quad (1)$$

где M- число клеток в 1 мл суспензии;

a - среднее число клеток в 1 квадрате сетки;

h - высота камеры, мм;

S - площадь 1 квадрата сетки, мм^2;

n - коэффициент разведения суспензии.

5. Построить графическую зависимость M = f(τ) жизнеспособности клеток от продолжительности их обработки определенным фактором (τ).

Проанализировать кинетику гибели микробных клеток во временных интервалах от 0 до 30 минут и от 30 до 60 минут.

6. Для каждого температурного режима и концентрации химического вещества рассчитать величину критерия стерилизации, определяемый как натуральный логарифм отношения жизнеспособных клеток после обработки к исходному количеству клеток.

7. По полученным результатам сделать развернутое заключение о характере влияния стерилизующего фактора, механизме его действия на клетки микроорганизмов, условиях эффективного воздействия фактора и области использования его в пищевой биотехнологии.

.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под асептикой?
2. Какие факторы внешней среды могут оказывать бактерицидное действие?
3. От каких параметров зависит интенсивность губительного воздействия?
4. Каковы причины гибели клеток микроорганизмов при воздействии высоких температур, излучения химических соединений?
5. Чем отличается пастеризация от стерилизации?
6. Какие химические вещества используют для обеспечения асептических условий?

ТЕМА 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические указания

Ферментация является определяющей стадией в биотехнологических производствах, в течение которой микроорганизмы растут и размножаются, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов в культуральной жидкости.

Основные этапы выращивания микроорганизмов

1. Приготовление питательной среды, посуды, оборудования и инструментов.

2. Стерилизация питательной среды.

3. Выращивание микроорганизмов (получение инокулята) на жидкой питательной среде.

4. Выращивание посевного материала на плотной питательной среде (внесение инокулята на питательную среду).

5. Выращивание микроорганизмов в ферментаторе.

6. Получение готового продукта – белково-витаминного концентрата.

К наиболее важным технологическим факторам биотехнологического производства относятся конверсия сырья, производительность производства и концентрация получаемого продукта. В любом микробиологическом процессе ключевую роль играет культура используемых микроорганизмов. В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты, бактерии и водоросли в виде чистых или смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам, выращиваемым в асептических условиях.

При *подборе* культуры микроорганизмов для промышленного производства наиболее важными являются следующие микробиологические факторы:

- способность синтезировать целевой продукт (экономический коэффициенты выхода продукта или продуктов);
- высокая скорость роста и/или скорости получения конечного продукта;
- сродство культуры-продуцента к углеродным и энергетическим субстратам;
- стабильность и неприхотливость культуры продуцента (устойчивость к заражению посторонней микрофлорой).

Для *выращивания* любой культуры необходимы: жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие ингибиторов роста и соответствующие физико-химические условия.

При получении жизнеспособного посевного материала, прежде всего, необходим подбор питательной среды. *Питательная среда* предназначена для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а так же для получения биомассы и/или ценных продуктов метаболизма. В состав питательной среды должны входить *органогенные элементы* (углерод, водород, кислород, азот), *зольные макроэлементы* (фосфор, сера, железо, калий, кальций, магний) и *микроэлементы* (марганец, хлор, натрий, медь, бор и т.п.), все перечисленные элементы должны входить в среду *в легкоусвояемом для микроорганизмов виде*.

Источниками углерода для гетеротрофных микроорганизмов могут быть углеводы (моносахариды и полисахариды), спирты, органические кислоты, углеводороды и другие соединения природного происхождения. Источниками азота в питательной среде могут быть белки, аминокислоты, соли аммония, нитраты и нитриты, а так же атмосферный азот. В качестве источника кислорода могут выступать различные соединения, но многие микроорганизмы нуждаются в атмосферном кислороде, и могут расти только в его присутствии. Остальные элементы вносятся в среду в виде водорастворимых солей. При выборе сырья для промышленного применения необходимо учитывать не только содержание основных элементов в нем, но и его себестоимость.

Обязательным условием осуществления многих биотехнологических процессов является *работа в асептических условиях*, поэтому решающее значение имеет стерилизация среды, а в случае аэробных процессов – и воздуха. Стерилизация (обеспложивание) – полное уничтожение в стерилизуемом материале как вегетативных, так и покоящихся форм микроорганизмов. Стерильность обеспечивают, обрабатывая стерилизуемый

объект *физическими* (температура, облучение, фильтрация) или *химическими средствами*.

В качестве физических средств на практике чаще всего используют влажную и сухую стерилизацию жаром, а так же стерилизацию фильтрованием. Влажной стерилизации подвергают среды и посуду, сухой – посуду и инструменты, стерилизации фильтрованием – воздух и лабильные (не стабильные) среды. Сухая стерилизация менее эффективна, чем влажная. Стерилизацию облучением (УФ-свет) используют для стерилизации воздуха помещений и поверхностей.

Асептические условия можно поддерживать с помощью химических средств, которые используют при стерилизации основного и вспомогательного оборудования. Гибель микроорганизмов способны вызвать химические вещества, которые специфически или неспецифически связываются с белками, инактивируя определенные группы активных ферментов. К таким неспецифическим веществам относятся хлор, йод, формалин, фенол, а к специфическим – антибиотики, сульфамидные препараты и т.д.

При внесении в стерильную подходящую среду небольшого количества культуры микроорганизмов, они начинают интенсивно расти и размножаться. В результате роста и размножения клеток микроорганизмов в питательной среде увеличивается биомасса. Ее количество можно охарактеризовать по сухой массе клеток на единицу объема (мг/л, г/л), в том случае если клетки имеют примерно одинаковые размеры, то и по числу клеток в единице объема (млн./мл, млрд./мл).

Методы контроля микробиологического процесса

Рост и размножение культуры можно определить различными методами:

- центрифугируя или фильтруя культуральную, жидкость через мембранный фильтр и высушивая полученную пасту до постоянной массы;

- нефелометрически, измеряя светопоглощение клеточной суспензии;

- определяя содержание азота в биомассе, полученной из определенного объема питательной среды;

- по интенсивности выделения какого-либо вещества (газа, кислоты и т.п.).

Число клеток в культуральной жидкости определяют:

- микроскопически, прямым подсчетом клеток, используя специальные камеры Горяева, Тома и др.;

- по подсчету выросших колоний в чашках Петри.

Рост микроорганизмов и его математическое описание

Существует два способа культивирования популяции микроорганизмов в глубине жидкой среды: периодический и непрерывный.

При периодическом способе культивирования популяции микроорганизмов проходит шесть фаз размножения: лаг-фазу I, переходную фазу II, фазу экспоненциального или ускоренного роста III, фазу замедленного роста IV, стационарную фазу V, фазу отмирания VI (рисунок 3).

Вид кривой роста дрожжей меняется в зависимости от условий культивирования, но последовательность фаз остается той же.

Для характеристики динамики биотехнологического процесса используют кинетические и стехиометрические параметры.

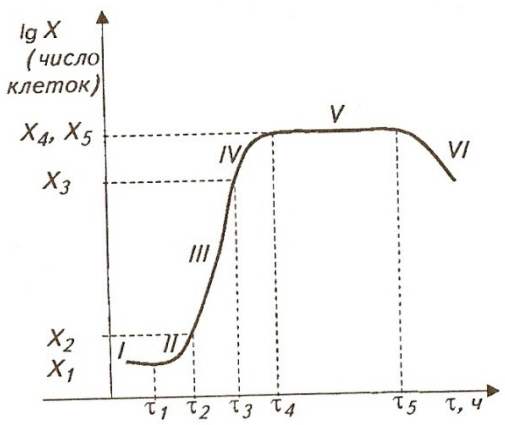


Рисунок 3 – График накопления числа бактериальных клеток при культивировании на питательных средах

Кинетические параметры характеризуют изменение процесса во времени. К ним относятся такие параметры как удельная скорость роста (μ) и метаболитический коэффициент (q). Для характеристики развития культуры микроорганизмов используют скорость роста культуры *V* (изменение количества биомассы в единицу времени):

$$V = \frac{dX}{dt}.$$

Чтобы определить, с какой скоростью идет прирост биомассы от исходного её количества за определенный промежуток времени используют среднюю скорость роста:

$$V = \frac{x - x_0}{\tau - \tau_0},$$

где x_0, x – количество биомассы в начале и конце культивирования, кг/м^3;

τ_0, τ – начальное и конечное время отсчета, ч.

Если прирост биомассы в единицу времени отнести к одной единице активной биомассы, то удельную скорость роста можно вычислить по формуле:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{d\tau}$$

Среднюю удельную скорость роста за период $t_2 - t_1$ при увеличении биомассы на X_2 и X_1 определяют по формуле:

$$\mu_{ср} = \frac{1}{X_{ср}} \cdot \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}.$$

Скорость потребления определенного субстрата растущими культурами часто описывается метаболитическим коэффициентом:

$$q_s = \frac{1}{S_{ср}} \cdot \frac{S_0 - S_1}{(t_1 - t_0)},$$

где S_0, S_1 – концентрация субстрата в среде в начале и в конце культивирования.

В общем случае метаболитический коэффициент характеризует долю субстрата, используемого для роста определенного количества биомассы за определенный промежуток времени.

Кинетические параметры не дают целостной картины без учета стехиометрических коэффициентов.

Стехиометрические коэффициенты характеризуют соотношение между исходными и конечными продуктами. При любой количественной оценке роста микроорганизмов и/или синтеза конечного продукта необходимо связать *образование микробной биомассы* и продуктов (конечного продукта) *с расходованием субстра*тов (начального продукта) и питательных веществ. Если количество полученной биомассы обозначить X, а внесенного посевного материала S, то экономический коэффициент (урожай), определяют по формуле:

$$Y_{x/s} = \frac{X_2 - X_1}{S_1 - S_2},$$

где S_2 и S_1 – концентрация субстрата в среде в начале и в конце культивирования.

Экономический коэффициент ($\mathbf{Y_{x/S}}$), который иногда называют выходом биомассы, имеет большое значение, как для характеристики физиологических свойств культуры, так и в практическом при получении биомассы или синтезе какого-либо продукта. Он позволяет связать стехиометрические коэффициенты с кинетическими коэффициентами.

$$q = \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

Такой показатель, как выход по массе имеет существенный недостаток, так как не характеризует энергосодержание субстрата. Так процессы роста микроорганизмов на глюкозе и этаноле могут иметь одинаковые экономические коэффициенты, но разные энергетические.

Энергетический выход (**η**) характеризует долю энергии субстрата, перешедшую к биомассе. Органические вещества, используемые микроорганизмами в качестве субстрата, различны по своему энергосодержанию. Чем выше степень восстановленности субстрата, тем больше количество энергии может быть получено микроорганизмами при его ассимиляции. Количественно степень восстановленности органических веществ есть число электрон-эквивалентов, передаваемых окислителю при полном окислении веществ $CH_pO_nN_q$, в расчете на один грамм-атом углерода.

$$\gamma = 4+p-2n-3q$$

Связь между энергетическим выходом и выходом по массе находят по уравнению:

$$\eta = (\sigma_x\gamma_x / \sigma_s\gamma_s) \cdot Y_{x/s},$$

где σ_x, σ_s – весовая доля углерода в биомассе и субстрате, соответственно;

γ_x, γ_s – степень восстановленности биомассы и субстрата, соответственно;

$Y_{x/s}$ – выход по массе.

Практическая работа № 3

Изучение кинетики роста дрожжей при глубинной ферментации

Цель работы: Изучить кинетику роста дрожжей при глубинном культивировании.

Задачи:

1. Провести периодический процесс культивирования дрожжей рода *Saccharomyces* на синтетической среде с использованием глюкозы или сахарозы в качестве источника углерода и энергии.

2. По результатам эксперимента вычислить основные технологические характеристики периодического процесса глубинной ферментации дрожжей.

Ход работы

1. Построение калибровочной прямой для определения абсолютно сухой биомассы и количества клеток микроорганизмов.

Для построения калибровочного графика готовят 6 суспензий дрожжей разной концентрации. Светорассеяние суспензий измеряют на спектрофотометре в кювете с длиной светового пути 0,5 см при длине волны 490 нм. В каждой из 6 суспензий определяют количество клеток дрожжей в счетной камере Горяева-Тома и абсолютно сухую биомассу (АСБ), используя метод высушивания до постоянной массы. Результаты измерений приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Количество клеток дрожжей в суспензиях, АСБ и соответствующие показания спектрофотометра

Показатели	Суспензия дрожжей					
	1	2	3	4	5	6
Количество клеток, млн/мл	0	43	81	121	163	212
АСБ (г/л)	0	1,25	2,43	3,58	4,86	5,97
Показания спектрофотометра	0	0,21	0,4	0,59	0,8	1,02

2. Подготовка посевного материала и питательной среды

Дрожжи пересеиваются с музейной культуры на свежий скошенный сусло-агар. Полученные косяки выдерживают в термостате при температуре 30°С в течение суток. Через сутки производят смыв выросшей на косяках культуры в стерильных условиях стерильным физиологическим раствором. Полученную таким образом суспензию дрожжей (инокулят), используют для засева в ферментер на синтетическую питательную среду заданного состава.

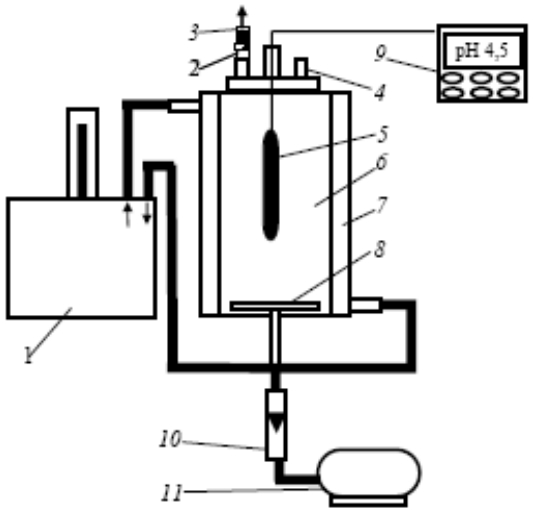
Состав питательной среды: глюкоза – 9 %; диаммонийфосфат – 0,3 %; аммоний сернокислый – 0,16 %; хлористый калий – 0,06 %; магний сернокислый – 0,02 %. Замерить величину pH раствора на ионометре и довести при необходимости до 4,5 70 % ортофосфорной кислотой или аммиачной водой.

3. Культивирование дрожжей

Экспериментальные данные для определения технологических показателей процесса культивирования получают на лабораторной установке (рисунок 4).

Установка состоит из емкости объемом 1 л для выращивания дрожжей *6*, снабженной барботером *8* для равномерного распределения воздуха, нагнетаемого компрессором *11*. Отработанный воздух очищается, проходя систему фильтров *2*. Емкость культиватора снабжена рубашкой *7*, в которую подается вода от ультратермостата*1*для поддержания температуры процесса выращивания. Уровень pH и температура среды измеряется электродом *5* ионометра*9*. Расход воздуха, устанавливается ротаметром *10*.

Перед началом процесса ферментации произвести асептическую обработку емкости культиватора этанолом. После чего заполнить его питательной средой, отобрав в пробирку 15 мл исходной смеси для определения в ней содержания сахара. Включить ультратермостат и нагреть питательный раствор до температуры 30-31 °С. После чего через штуцер *8* ввести через воронку суспензию засевных: дрожжей (посевного материала) в количестве 12 % к объему питательной среды. Температура среды в течение процесса, также как и pH среда контролируется с помощью ионометра, электрод которого постоянно находится в жидкости. Включить компрессор *3* и установить расход воздуха равный из расчета 5- 0 $м^3/м^3ч$ с помощью ротаметра *10*. Отработанный воздух удаляется через штуцер *3*, снабженный фильтром *2* из активированного угля и стекловаты для задержки капель среды и клеток дрожжей.



1 – ультротермостат; *2* – фильтр очистки воздуха; *3* – штуцер выхода воздуха; *4* – штуцер ввода среды и отбора проб; *5* – электрод pH – метра; *6* – емкость культиватора; *7* – рубашка; *8* – барботер; *9* – ионометр; *10* – ротаметр; *11* – компрессор

Рисунок 4 – Схема лабораторной установки для выращивания дрожжей

Отсчет времени культивирования следует начинать с момента внесения в питательную среду засевных дрожжей. Первую пробу для определения начальной концентрации дрожжевых клеток x_0 отбирают в количестве 1 мл стерильной пипеткой через штуцер *4* через 1-3 мин после начала процесса. Длительность ферментации составляет 24 часа, отбор проб производят через каждые 3 часа для определения x_n – количества выросшей биомассы.

4. Анализ проб, отобранных в ходе культивирования дрожжей

В каждой пробе определяют содержание АСБ, количество клеток, концентрацию сахара.

4.1 Определение АСБ и количества клеток

При тех же условиях, в которых измеряли светорассеяние в суспензиях дрожжевых клеток при построении калибровочной кривой (длина волны света, толщина кюветы), измеряют светорассеяние проб, отобранных в динамике развития исследуемой культуры дрожжей (каждые 3 часа в течение 24 часов),

на спектрофотометре. По калибровочному графику определяют абсолютно сухую биомассу и количество клеток.

4.2 Определение концентрации сахара

В каждой пробе, начиная с исходного момента культивирования, определить содержание сахара в среде, как основного углеродосодержащего субстрата, для этого рекомендуется использовать йодометрический метод определения сахара в биологических объектах.

Основой **йодометрического метода** является **способность редуцирующих сахаров** (глюкозы и мальтозы) окисляться йодом до соответствующих кислот. Определению предшествует холостой опыт, в котором определяется соотношение между приготовленными 0,1 н растворами йода (25 мл) и тиосульфата натрия. Его проводят, как указано ниже, только вместо 10 мл разбавленного основного раствора в коническую колбу отмеривают 10 мл дистиллированной воды.

Основной раствор, содержащий сахарозу, разбавляют в 10 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ отмеривают пипеткой 10 мл основного раствора, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

10 мл полученного раствора пипеткой переносят в коническую колбу вместимостью 250-400 $см^3$, туда же отмеривают пипеткой 25 мл 0,1 н раствора йода и медленно приливают из бюретки 30 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия. Содержимое колбы тщательно перемешивают, накрывают колбу часовым стеклом или закрывают пробкой и ставят в темное место на 15-20 мин. Затем вносят 4,5-5 мл 1 н раствора серной кислоты и титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия до светло-желтого окрашивания, в конце добавляют 1 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания.

Массовая доля редуцирующих веществ в пересчете на сухое вещество (%) определяют по формуле:

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

где V_0 – объем 0,1н раствора тиосульфата натрия, израсходанного на титрование 25 мл 0,1 н раствора йода в холостом опыте, мл;

V – объем 0,1н раствора тиосульфата натрия, израсходанного на титрование при анализе, мл;

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

K – поправочный коэффициент к нормальности раствора тиосульфата натрия;

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

c – массовая доля сухих веществ сахарозы, %.

Полученные результаты вносят в таблицу 3.

5. Обработка полученных результатов

Пользуясь калибровочной кривой (табл.2), определяют количество клеток дрожжей (млн/мл) и АСБ в отобранных пробах. Данные вносят в таблицу 3.

Таблица 3 – Результаты культивирования дрожжей

Время культивирования, час	Показания спектрофото-метра	Количество клеток, млн/мл	Количество АСБ, мг/мл	Содержание сахара, мг/мл
0				
3				
6				
9				
12				
15				
18				
21				
24				

На основе данных таблицы 3 строят кривую роста культуры микроорганизмов. Рассчитывают удельную скорость роста μ, метаболитический коэффициент q, выход по массе $Y_{X/S}$дрожжей. Временную

зависимость представляют в виде графика удельной скорости роста дрожжей, метаболитического коэффициента и урожая.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные отличия периодического и непрерывного культивирования.
2. Какие фазы размножения проходит биомасса клеток в условиях периодического культивирования?
3. Какие показатели используют для характеристики процессов роста популяции микроорганизмов?
4. В каких единицах измеряется удельная скорость роста, общая скорость роста?
5. С помощью какого устройства регулируется температура процесса?
6. Какова доза посевного материала?
7. В чем сущность метода определения углеродосодержащего субстрата в работе?
8. Какой метод используется для определения концентрации биомассы?

Тема 4. ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙАКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Методические указания

Научное обоснование применения и механизм действия ферментных препаратов

Ферменты и ферментные препараты широко используются в различных отраслях сельского хозяйства, в том числе и в животноводстве. Это обусловлено их уникальными свойствами: эффективностью и специфичностью действия, нетоксичностью, способностью работать в мягких условиях,

перерабатывать различное сырье растительного и животного происхождения, в том числе и отходы.

В последние десятилетия ферментные препараты активно применяются в рационах и комбикормах для различных видов сельскохозяйственных животных с целью повышения переваримости и усвояемости труднодоступных форм питательных веществ (некрахмлистых полисахаридов, арабиноксиланов, крахмала и др.) и минеральных комплексных соединений с фитиновой кислотой и др.

Поскольку основным источником энергии для животных являются зерновые корма, следует учитывать, что углеводы в них неоднородны. Эта группа объединяет в различных количественных соотношениях крахмал, декстриты, целлюлозу, гемицеллюлозу, лигнин и т. д. Сдерживающим фактором для применения таких культур как ячмень, овес и рожь является наличие в них относительно большого количества пентозанов (включающих ксиланы и арабинаны), гексозанов (целлюлоза, β-глюканы, маннаны, галактаны), пектинов и лигнина.

Некрахмальные полисахариды (НПС) относятся к структурным или остовым, и являются наиболее важными компонентами всех растительных клеточных стенок. Содержание их в пшенице достигает 11, ячмене – 17, овсе – 30, тритикале – 10, подсолнечном шроте – 28, рапсовом шроте – 19 и отрубях пшеничных – 34%.

Моногастричные животные (свиньи, птица) особенно остро реагируют на повышенные уровни некрахмальных полисахаридов в рационах, так как их пищеварительные железы не вырабатывают ферменты, способные гидролизовать НПС, а роль микрофлоры желудочно-кишечного тракта в этом процессе незначительна. НПС образуют комплексы с питательными веществами (белков с ксиланами и пектином, липидов с пектинами), что затрудняет гидролиз последних. В тонком кишечнике сильно набухающие полисахариды создают вязкую, гелеобразную структуру, в которой затруднены гидролиз питательных компонентов и их всасывание. Замедленное

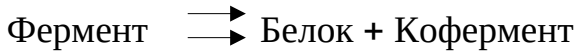
неправильное пищеварение и высокая обводненность содержимого кишечника способствуют развитию инфицирующей микрофлоры, вызывают поносы.

Действия ферментов в природе весьма многообразны и все проявления жизни связаны с их функциями. Под влиянием ферментов в желудочно-кишечном тракте животных происходит расщепление питательных веществ корма: сложные углеводы распадаются на простые сахара и жирные кислоты, белки на пептиды и аминокислоты, жиры на высшие жирные кислоты и глицерин. Только благодаря ферментам указанные питательные вещества превращаются в энергию и структурные материалы, необходимые для роста и воспроизводства, образования продукции и осуществления других процессов в организме животного.

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы. Наличие у белков каталитических свойств обусловлено следующими их особенностями: 1) сочетание двух начал – устойчивости и изменчивости, так как у белков разный уровень структуры. Первичная структура стабильна, а вторичная, третичная и четвертичная – лабильны; 2) многообразием функциональных групп на поверхности белка, способных вступать во взаимодействие с иными химическими соединениями; 3) сложностью первичной структуры; 4) многообразием физических и химических превращений; 5) способностью к внутримолекулярным взаимодействиям; 6) способностью отвечать на внешнее воздействие изменением конформации молекулы и восстанавливать исходное состояние по прекращению воздействия.

Ферменты – простые белки – носят название однокомпонентных (при их гидролизе обнаруживаются только аминокислоты). Было установлено, что большинство гидролитических ферментов относится к классу простых белков – протеинов. К протеинам, близким по физико-химическим свойствам к глобулинам, относятся пепсиноген, пепсин, трипсиноген, трипсин, папаин, уреаза и др. Ферменты – сложные белки – называются двухкомпонентными. Небелковые компоненты этих ферментов – коферменты, или простетические группы, могут легко отделяться от белка и устраняться при диализе, а могут

быть тесно связаны с белками, и отделяться только при воздействии факторов, денатурирующих белки. Иногда связь с коферментом настолько непрочна, что в растворе устанавливается равновесие между недиссоциированными молекулами фермента и продуктами его диссоциации (белковым компонентом и коферментом):



Специфические свойства дляодно- и двухкомпонентных ферментов всегда определяются белком. Каждое составляющее двухкомпонентный фермент в отдельности не обладает ферментативным действием. Для проявления ферментативного действия оба компонента должны быть взаимно связаны *(Р. П. Виноградова, 1978)*.

По типу общей структурной организации можно выделить несколько групп ферментов: 1) Ферменты, образованные одной полипептидной цепью (лизоцим). 2) Ферменты, образованные несколькими полипептидными цепями, соединенными дисульфидными мостиками (химотрипсин). 3) Олигомерные ферменты, образованные несколькими идентичными (мышечнаяфосфорилаза) или различными (аспартаткарбамоилтрансфераза из E. coli) субъединицами, связанными нековалентными связями. 4) Полифункциональные ферментные ансамбли. В таком ансамбле одна полипептидная цепь образует активные центры нескольких функционально связанных ферментов (в клетках млекопитающих первые три фермента пути биосинтеза пиримидинов – карбамоилфосфатсинтетаза, аспартат-карбамоилтрансфераза и дигидрооротаза образованы одной полипептидной цепью с молекулярной массой 2150 кДа). 5) Полиферментные комплексы. В состав таких комплексов, образованных за счет нековалентных взаимодействий, входит несколько индивидуальных ферментов; обычно эти ферменты функционально взаимосвязаны и катализируют серию последовательных реакций.

Ферменты делятся на группы в зависимости от типа катализируемой реакции и на подгруппы, более точно характеризующие эту реакцию. Каждый фермент получает название, состоящее из 1) названия субстрата и 2) слова

имеющего окончание – аза и определяющего тип реакции, катализируемой всеми ферментами этой группы, к которой принадлежит данный фермент.

Комиссия по ферментам в своем докладе 1961 г. разработала основанную на классификации систему присвоения кодовых чисел (шифров). Шифр каждого фермента содержит четыре числа, разделенных точками, и составляется по следующему принципу: 1) первое число указывает, к какому из шести основных классов (см. ниже) принадлежит данный фермент; 2)второе число обозначает подкласс (у трансфераз оно обозначает – природу транспортируемой группы, угидролаз – тип гидролизуемой связи); 3)третье число обозначает подподкласс (у оксидоредуктаз оно указывает для каждой группы доноров тип участвующего в реакции акцептора); 4)четвертое число обозначает порядковый номер фермента в данном подподклассе.

Международный биохимический союз рекомендовал классификацию, в которой ферменты сгруппированы в 6 классов в соответствии с типом катализируемых реакций: 1)оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы.

Принятый метод классификации удобен тем, что химические реакции, катализируемые ферментами, можно разбить на сравнительно небольшое число типов *(М. Диксон, Э. Уэбб, 1982)*.

Скорость реакции, катализируемых ферментами зависит от химической природы реагирующих веществ (субстратов, ферментов) и от условий их взаимодействия (концентраций компонентов, pH, температуры, состава среды, действия активаторов, ингибиторов и т. д.).

Изменение концентрации водородных ионов в среде, в которой протекает ферментативная реакция, сопровождается значительным изменением ее скорости. Каждый фермент проявляет максимальное для него действие при определенном значении pH, которое носит название pH – оптимум. Незначительные изменения pH замедляют действие ферментов или совсем его прекращают.

Скорость инактивации ферментов также в большинстве случаев сильно зависит от pH раствора. Влияние pH на инактивацию различных ферментов может быть различным. Обычно имеется область максимальной стабильности фермента, причем она не обязательно располагается вблизи его изоэлектрической точки. Инактивация увеличивается при сдвиге в кислую или щелочную сторону от этой области. Многие ферменты уже при pH 4-5и 8-10 инактивируются даже при комнатной температуре.

Влияние температуры на ферментативную реакцию различно. Температура воздействует на все стадии процесса (образование фермент-субстратного комплекса, превращение его в комплекс фермент-продукт и диссоциация последнего). Влияние температуры на ферментативные реакции принято выражать с помощью температурного коэффициента Q_{10}, показывающего, во сколько раз увеличивается скорость реакции при повышении температуры на 10 ^{0}C. Температурный коэффициент ферментативных реакций обычно лежит в пределах 1 –2. Скорость инактивации ферментов в растворе быстро возрастает с повышением температуры; почти во всех случаях инактивация происходит практически мгновенно при значениях температуры, близких к 100^{0}C, в большинстве же случаев она наступает при температуре около 70^{0}C. Тепловая инактивация ферментов почти всегда является результатом денатурации белка. В ряде случаев тепловая денатурация оказывается обратимой. Ярким примером может служить нуклеотид-пирофосфатаза, которая полностью инактивируется за 10 минут при 70^{0}C и полностью реактивируется при охлаждении до 37^{0}C. Непрогретые препараты фермента содержат термолабильный ингибитор, и фермент остается неактивным до тех пор, пока ингибитор не будет удален в результате нагревания до 100^{0}C в присутствии субстрата фермента (пирофосфата), который предохраняет фермент от инактивации*(Р.П.Виноградова, 1978, М. Диксон, Э. Уэбб, 1982)*.

Накопленные теоретические знания о природе ферментов и их механизма действия на субстрат, включая воздействие на организм животных, послужили

основанием для использования их в кормлении сельскохозяйственной птицы, крупного рогатого скота и свиней.

Ферментные препараты

В последние годы большой популярностью стали пользоваться ферментные препараты. Так, мацеробациллин Г3х обладает высокойпектатрансэлиминазной и ксиланазной активностью. Его применение при откорме бычков увеличивает среднесуточный прирост на 15,4 %, снижает затраты кормов на 1 кг прироста на 13,4 %, оказывает выраженное стимулирующее влияние на микрофлору рубца, благоприятно влияет на переваримость питательных веществ и эффективность использования корма, на гематологические и биохимические показатели крови, на состояние здоровья молодняка и качество мясной продукции. Близкими в этом отношении оказались целловиридин Г20х, пектофоетидин П10х, протосубтилин Г3х и амилосубтилин Г3х. Например, введение в рацион дойных коров ферментного препарата амилосубтилина Г3х приводит не только к повышению среднесуточных удоев (на 6,1 - 12,3 %), но и к нормализации сложнейших биохимических процессов: глюконеогенеза и мочевинообразования. Такие мультиэнзимные композиции, как МЭК-1 и МЭК-2 способствуют повышению прироста живой массы телят молочного периода выращивания при снижении затрат кормов. Отечественная биотехнологическая промышленность выпускает и другие мультиэнзимные композиции (МЭК-СХ), которые оказались эффективными по следующим параметрам: лучшее переваривание поступающих питательных веществ, усиление углеводно-липидного и азотистого обменов, увеличение прироста живой массы телят и продуктивности коров, снижение затраткормов.

Жидкая кормовая добавка фекорд Б, содержащая комплекс гидролитических ферментов – целлюлазу, ксиланазу и β-глюканазу, полученные при ферментации гриба *Trichodermareesei*, а также смесь биомасс грибов *Trichodermareesei*, *Aspergillusawamori*и бактерий *Bacillussubtilis*, стимулирует яйценоскость кур, способствует повышению живой массы цыплят,

увеличению переваримости питательных веществ корма молодняком крупного рогатого скота.

Лабораторные и научно-хозяйственные опыты доказали целесообразность использования в качестве добавок к рационам сельскохозяйственных животных и птиц таких мультиэнзимных комплексов как авизим и порзим, ронозим, натуфос и натугрейн бленд, био-фид-вит и био-фит-плюс, роксазим G2-гранулят, оллзаймидр.

Производство ферментных препаратов. Технологические процессы производства ферментных препаратов можно разделить на 2 группы: в первом случае ферментация ведется глубинным методом в жидкой питательной среде, во втором – используется поверхностная культура, растущая на специально подготовленной рыхлой и увлажненной питательной среде.

Основные этапы глубинного метода культивирования продуцентов ферментов:

- получение посевного материала: исходная культура продуцента → маточная культура, выращенная в колбах на качалке → посевная культура, выращенная в инокуляторе → посевная культура, выращенная в посевном аппарате. Объем посевного аппарата обычно составляет до 10 % от объема промышленного ферментатора;

- приготовление питательных сред;

- стерилизация питательных сред с помощью мембран или высокихтемператур;

- очистка воздуха до и послеаэрирования;

- производственноекультивирование.

Глубинный метод более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации, легче и проще осуществляется переход к большим масштабам производства. Этот процесс должен проходить в строго асептических условиях, а концентрация ферментов в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры.

При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Недостатками метода является необходимость иметь большую поверхность контакта рыхлой среды с воздухом, что часто отражает неинтенсивный характер процесса. Мойка, стерилизация, перемещение кювет с небольшой высотой слоя, их заполнение и освобождение требует больших затрат ручного труда. Выращивание культуры проходит в неасептических условиях. Преимущества поверхностного метода: конечная концентрация фермента на единицу массы среды более высокая, такие культуры легко выращивать и приводить в товарную форму, снижена потребность в электроэнергии и т.д. Культура микроорганизмов, выращенная поверхностным методом, и культуральная жидкость после глубинного культивирования содержит большое количество балластных веществ: биомассу продуцента, непотребленные компоненты среды, продукты метаболизма. Доля собственно ферментов составляет около 1 % для поверхностных и не более 0,1% – для глубинных культур.

Практическая работа № 4

Исследование амилолитической и осахаривающей активности ферментных препаратов

Цель работы: Изучить амилолитическую активность ферментных препаратов.

Задачи работы:

1. Определитьамилолитическую и осахаривающую активность ферментных препаратов.

2. Сделать заключение о различиях в действии α- и β-амилаз.

Ход работы

1. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика использовать раствор растворимого крахмала с концентрацией 0,1%. Из исходного раствора крахмала приготовить растворы с уменьшающейся концентрацией по схеме:

Раствор №1: 2 мл (исходного раствора, 1 мг/мл);

Раствор №2: 9 мл (исходного раствора) + 1 мл дист.воды;

Раствор №3: 8 мл (раствора №2) + 1 мл дист. воды;

Раствор №4: 7 мл (раствора №3) + 1 мл дист. воды;

Раствор №5: 6 мл (раствора №4) + 1 мл дист. воды;

Раствор №6: 5 мл (раствора №5) + 1 мл дист. воды;

Раствор №7: 4 мл (раствора №6) + 1 мл дист. воды;

Раствор №8: 3 мл (раствора №7) + 1 мл дист. воды;

Раствор №9: 2 мл (раствора №8) + 2 мл дист. воды;

Раствор №10: 2 мл (раствора №9) + 2мл дист. воды;

Содержимое пробирок перемешать. В каждую пробирку добавить по 2 мл рабочего раствора йода (на 0,1н растворе соляной кислоты). Содержимое пробирок тщательно перемешать и измерить оптическую плотность растворов на спектрофотометре при λ=670 нм. Измерение начать с наименее окрашенного раствора.

Для приготовления раствора сравнения использовать те же реактивы, только вместо раствора крахмала добавить дистиллированную воду. Полученные данные внести в таблицу 4 и построить калибровочную кривую.

Таблица 4 – Данные для построения калибровочной кривой

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрация крахмала, мг\мл										
Оптическая плотность										

2. Определение активности амилолитических ферментов

В штативе расположить пронумерованные пробирки в два ряда. Во все пробирки прилить по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку, расположенную в первом ряду прилить 1 мл раствора амилосубтилина (α-амилазы) и тщательно перемешать содержимое, продувая воздух из груши через пипетку. Отобрать из первой пробирки пипеткой 1 мл и перенести во вторую пробирку в том же ряду. Из второй пробирки после перемешивания отобрать 1 мл и перенести в третью пробирку. Аналогичным методом последовательного разбавления приготовить растворы в четвертой и пятой пробирках.

В пробирках второго ряда аналогичным образом путем последовательного разбавления приготовить растворы глюкаваморина (β-амилазы).

Подготовленные в пробирках растворы поместить на 10 минут в термостат при температуре 40 °С для прогревания. Далее во все пробирки добавить пипеткой по 2 мл 0,1% раствора крахмала и снова поставить в термостат. Спустя 10 минут в каждую пробирку добавить по 2 мл рабочего раствора йода и определить оптическую плотность растворов на спектрофотометре при λ=670нм.

По полученным значениям оптической плотности, используя калибровочный график (построенный в п.1), рассчитать остаточную концентрации крахмала ($C_{ост}$, мг/мл) и количество гидролизовавшегося фермента ($C_{гидр}$, мг):

$$C_{гидр} = (C_{исх} – C_{ост})*V,$$

где $C_{исх}$ – исходная концентрация крахмала в растворе, мг/мл;

V – объем раствора крахмала, приливаемого в пробирку, мл.

Результаты эксперимента оформить в виде таблицы 4.

По полученным результатам определить концентрацию раствора ферментных препаратов с максимальной активностью.

Таблица 4 – Активность исследуемых амилаз

№ пробирки	Кратность разбавления раствора фермента	Активность ферментных препаратов					
		Оптическая плотность		$C_{ост}$, мг/мл		$C_{гидр}$, мг	
		растворы амилосубтилина	растворы глюкаваморина	растворы амилосубтилина	растворы глюкаваморина	растворы амилосубтилина	растворы глюкаваморина
1	2						
2	4						
3	8						
4	16						
5	32						

3. Определение осахаривающей активности ферментных препаратов

В две колбы объемом 100 см^3 внести пипеткой по 10 мл 0,1% раствора крахмала и поставить на 15 минут в термостат при температуре 40 °С для прогревания. Далее в первую колбу прилить 2 мл раствора амилосубтилина, во вторую 2 мл раствора глюкаваморина. Содержимое колб тщательно перемешать и поставить снова в термостат на 20 минут. По истечению указанного времени ферментативный гидролиз остановить, нагрев все две колбы на кипящей водяной бане. Оценку осахаривающей активности провести по реакции Фелинга. Для этого отобрать из каждой колбы по 1 мл полученных гидролизатов и перенести в отдельные пробирки. В каждую пробирку внести по 1 мл смеси реактивов ФелингI и ФелингII и прогреть на кипящей водяной бане в течение 5 минут. По количеству выпавшего осадка закиси меди оценить глубину гидролиза и количество образовавшихся восстанавливающих сахаров.

Контрольные вопросы

1. Какие продукты образуются при гидролизе крахмала α- амилазами?
2. Какие продукты образуются при гидролизе крахмала β- амилазами?
3. Перечислить свойства ферментов как биологических катализаторов.
4. Что понимают под гликолитической активностью?
5. Что понимают под амилолитической активностью?
6. Что понимают под осахаривающей активностью?
7. Охарактеризовать свойства амилолитических ферментов.

РАЗДЕЛ II. ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Тема 5. ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВОГО БЕЛКА

Методические указания

Микробиологическое производство кормового белка

Наиболее дефицитным компонентом пищи является белок. Согласно нормам питания человек должен ежедневно потреблять от 60 до 120 г полноценного белка. В рационе с/х животных на каждую к. ед. должно приходиться не менее 110 г кормового белка. В настоящее время мировая потребность в белке удовлетворяется лишь на 40%.

При дефиците белка в рационе в организме животных развиваются глубокие негативные изменения: отрицательный азотистый баланс, гипопротеинемии, нарушения коллоидно-осмотического и водно-солевого обмена, анемии различной формы, нарушения со стороны нервной, эндокринной и сердечно-сосудистой системы, сдвиги обмена веществ, остановка роста, истощение и т.д. Особенно тяжелые нарушения развиваются в молодом возрасте. Весьма опасно не только полное отсутствие белка в пище, но и недостаточное поступление его в организм или поступление некачественного белка. Белок корма должен содержать все аминокислоты, особенно незаменимые, быть по составу близок аминокислотному составу белков организма и легко перевариваться в желудочно-кишечном тракте.

Недостаток кормового белка в масштабах планеты по данным ФАО ООН оценивается примерно в 30 млн. т в год. Коренным образом изменить эту ситуацию возможно лишь нетрадиционным способом получения белковых веществ (кормовые препараты и белковые добавки) – микробиологическим синтезом. На сегодняшний день это самая крупная отрасль биотехнологии. Причем, продуцентами кормового белка могут быть бактерии, дрожжи, микроскопические водоросли, микро- и макромицеты.

Перспективность *производства биомассы с помощью микробного синтеза (перед другими источниками белка)* определяется следующими факторами:

- возможностью использования различных химических соединений, в т.ч. отходов производства;

- высокой интенсивностью синтеза белка, которая в 500-5000 раз выше, чем у растений или животных;

- в производстве микробного белка отсутствует многостадийность;

- процесс менее трудоемок по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белков, технология может осуществляться круглосуточно независимо от климатических и погодных условий, не требует огромных земельных площадей;

- процесс биосинтеза протекает в мягких условиях при температуре 30 – 45ºС, pH 3 - 6 и давлении ≈ 0,1МПа;

- относительно высоким содержанием белка, витаминов, углеводов, липидов и др. соединений (дрожжи накапливают до 60 %, бактерии – до 75 % белка по массе);

- повышенным содержанием незаменимых аминокислот;

- возможностью направленного генетического влияния на м/одля повышения содержания в них белка.

Для обозначения микробного белка, представляющего собой целые, неживые высушенные микробные клетки используется специальный термин – **белок одноклеточных микроорганизмов (БОО).** Это белковые продукты, синтезируемые монокультурой микроорганизмов и используемые в качестве пищевых добавок к рациону животных. Кроме высокого содержания белка микробная биомасса содержит также жиры, нуклеиновые кислоты, витамины и минеральные компоненты.Термин БОО был предложен в 1966 г. для обозначения биомассы различных микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов и водорослей).

БОО должен отвечать ряду специальных требований, главные из которых:

1) Питательность. У большинства микроорганизмов белок составляет значительную долю сухой массы клеток. При этом его питательность близка к традиционным белковым продуктам:

2) Перевариваемость. Микробная масса считается питательной, если ее компоненты перевариваются ферментами кишечного тракта высших животных и человека. Препятствием могут служить клеточные стенки отдельных продуцентов, а также высокий уровень нуклеиновых кислот, представляющий опасность для человеческого организма способный вызвать серьезные нарушения обмена веществ и различные патологические состояния.

3) Безопасность. Данные требования строго контролируются, и на сегодняшний день микробный белок используется, главным образом, в качестве кормового белка.

В качестве источника кормового белка чаще используют различные виды дрожжей.

Сырьевые источники для синтеза микробного белка весьма разнообразны и легко доступны. Для получения микробного белка необходим богатый углеродом, но дешевый субстрат (парафины нефти, метанол, этанол, растительная биомасса, молочная сыворотка и др.).

Принципиальная технологическая схема выращивания кормовой биомассы

Чистую культуру в *log*-стадии переносят в малый посевной аппарат (500 л) с питательной средой, pH которой доводится аммиачной водой или известковым молоком до 5,5 - 5,8. Сначала в аппарат подают около 40 л среды, разбавляют её в 4 - 4,5 раза стерильной водой и при интенсивной аэрации добавляют остальное количество питательной среды (80 - 100 л), pH среды – 4,5 - 5,5. Из качалочных колб вносят микробную суспензию объемом 1,5 - 2 л и

производят культивирование до накопления в среде 3,5 - 4,0 г клеток/л по абсолютно сухому веществ (АСВ). Обычно для этого требуется 15 - 18ч.

Суспензия из малого посевного аппарата подается в аппарат объемом 4 - 5 $м^3$, предварительно заполненный питательной средой (≈ 200 л) и стерильной водой (1,2 - 1,5 $м^3$), включается аэрация и при постоянном доливе (70 - 75 л/ч) питательной среды и добавления аммиачной воды для поддержания заданного pH проводится культивирование 10 - 12ч.

Выращивание засевной культуры проводится в ферментаторе объемом 15 - 20 $м^3$. Аппарат на 10 % по объему заполняется стерильной или кипяченой водой, туда же вводится около 0,5 $м^3$ питательной среды и полностью перекачивается все содержимое предыдущего аппарата (2,5 - 2,7 $м^3$). Выращивание посевного материала без отбора суспензии продолжается 8 - 9 часов при интенсивной аэрации и постоянном доливе питательной среды (170 - 200 л/ч) до накопления в ферментере биомассы в количестве 4 - 5 г АСВ/л. После этого засевную культуру начинают отбирать на основное производство в количестве 1,3 - 1,7 $м^3$/ч при одновременном доливе питательной среды.

Процесс ферментации длится от 5 до 10 суток, а затем цикл приготовления посевного материала возобновляется. К подготовительным стадиям производства относится приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, необходимых для нормального развития микроорганизмов. Этот участок имеет свою технологическую схему. Минеральные компоненты группируют в два раствора, которые параллельно подаются в основной ферментатор: раствор всех микроэлементов (N, P, K), необходимое количество которых составляет 5 - 70 г/л; раствор микроэлементов (Mg, Mn, Fe, Zn и др.), концентрации которых не превышают 5 - 10 мг/л.

Технологические потоки из всех подготовительных отделений (компримирование воздуха, хранение и подготовка сырья, получение засевной культуры, приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, технологическая вода, аммиачная вода, стерильная культуральная жидкость) поступают на главную стадию производства – *стадию ферментации.*

Основным аппаратом в этом отделении является ферментатор – аппарат полного смешения по жидкой фазе, обеспечивающий рост и развитие популяций микроорганизмов в объеме жидкой фазы; транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов; отвод от микробных клеток продуктов их обмена; отвод из среды тепла.

Затем следуют другие этапы технологической схемы получения кормовой биомассы:

– *сгущение суспензии микроорганизмов.* При этом концентрация биомассы повышается до 12 - 16 % АСВ. Для этого используют сепараторы, а также флокуляцию, коагуляцию, флотацию или декантацию;

– *термообработка суспензии.* При нагревании микроорганизмов до температуры 75 - 85 ºС в течение 10 - 40 мин происходит гибель штамма-продуцента и практически всей сопутствующей микрофлоры;

– *концентрирование суспензии.* Проводят в отделении выпаривания до концентрации 23 - 25 % АСВ. Для этого используется трехкорпусная вакуум-выпарная установка: I корпус – 90 ºС, II – 75 и III – 60ºС;

– *сушка.* В этом отделении происходит образование готового продукта с влажностью ≈ 10 % (по массе). Для этого используются конвективные сушилки (распылительные, кипящего слоя, ленточные и барабанные);

– *грануляция и сушка.* Обычно сухая биомасса, содержащая 8 - 10 % (по массе) влаги представляет собой готовый продукт и после упаковки направляется на склад к потребителю. Если продукт необходимо получить в виде гранул, то сухая и влажная (после выпарки) биомасса в соотношении 1:1 поступает в гранулятор. При этом влажная биомасса налипает на сухие частицы и вся масса влажностью 45 - 50 % движется в аппарате, формируя гранулы, которые затем подаются в сушилку кипящего слоя. Гранулы подсушиваются до остаточной влажности 8 - 10 % (по массе) горячим воздухом или топочными газами с температурой 260 - 300ºС;

– *фасовка и упаковка готового продукта.* Сухая биомасса поступает в приемный бункер и фасуется в бумажные мешки с клапаном массой 25 - 30 кг.

Эти мешки укладываются на специальные поддоны, которые отвозят их на склад или отгружают потребителю.

Практическая работа № 5
Определение качественных показателей кормовых дрожжей

Цель работы: Освоить методики анализа качественных показателей кормовых дрожжей.

Задачи работы:

1. Определить органолептические показатели дрожжей.

2. Определить физико-химические показатели дрожжей (массовую долю влаги, кислотность, массовую долю белков, крупность гранул).

Ход работы

1. Подготовка проб к испытаниям

Часть средней пробы (около 400 г) просеивают через штампованное сито или решетное полотно с ячейками диаметром 0,2-0,3 мм. Остаток на сите измельчают на лабораторной мельнице и просеивают до тех пор, пока весь остаток не пройдет через сито. Просеянный продукт насыпают в тару вместимостью 0,5 $дм^3$ с плотно закрывающейся крышкой или пробкой и используют для проведения испытания.

Гранулированный продукт перед просеиванием измельчают.

Для определения массовой доли сырого протеина и белка по Барнштейну продукт измельчают до пылеобразного состояния.

Для проведения испытаний по микробиологическим показателям гранулированный продукт растирают в фарфоровой ступке по ГОСТ 9147. Ступку и пестик перед использованием стерилизуют фламбированием.

2. Определение внешнего вида, цвета и запаха

Для определения внешнего вида и цвета навеску продукта массой около 250 г рассыпают на белую чистую поверхность и рассматривают при естественном свете.

Запах определяют органолептически.

3. Определение массовой доли влаги

Сущность метода заключается в высушивании навески продукта до постоянной массы при установленных температуре и времени; массовую долю влаги определяют как отношение потери в массе после высушивания к массе исходной навески продукта.

Проведение испытания.

Во взвешенную бюксу помещают 2-4 г продукта, разравнивая его равномерным слоем по дну бюксы. Бюксу с продуктом закрывают крышкой и взвешивают.

Открытую бюксу и крышку от нее помещают в сушильный шкаф, нагретый до температуры (130±5) °С, и высушивают 40 мин. По истечении 40 мин бюксу с помощью тигельных щипцов закрывают крышкой, вынимают из сушильного шкафа и ставят в эксикатор для охлаждения до комнатной температуры. Затем бюксу с закрытой крышкой взвешивают. Все результаты взвешиваний записывают с точностью до четвертого десятичного знака.

Проводят два параллельных определения.

Обработка результатов.

Массовую долю влаги (W) в процентах вычисляют по формуле (1)

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \cdot 100, \quad (1)$$

где m_1 – масса бюксы с навеской до высушивания, г;

m_2– масса бюксы с навеской после высушивания, г;

m – масса пустой бюксы, г.

Результат округляют до второго десятичного знака. Из результатов двух параллельных определений вычисляют среднее арифметическое значение с

тем же числом знаков после запятой и определяют расхождение между каждым результатом и средним арифметическим значением. Допускаемое относительное расхождение не должно превышать 5%, округленных до целого числа.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, которое округляют до первого десятичного знака.

4. Определение кислотности кормовых дрожжей

Навеску дрожжей (10 г) помещают в фарфоровую ступку и растирают её пестиком, постепенно доливая воду (всего 50 мл). В полученную суспензию добавляют 3-5 капель фенолфталеина и титруют смесь 0,1 н раствором гидроксида натрия до появления слабого розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Кислотность дрожжей (X), в пересчете на уксусную кислоту (в мг на 100 г дрожжей), вычисляют по формуле (2):

$$X = V \times 6 \times K \times 10, \quad (2)$$

где X – кислотность дрожжей в пересчете на уксусную кислоту;

V – количество 0,1 н раствора щелочи, пошедшее на титрование, мл;

6 – количество уксусной кислоты, эквивалентное 1 мл 0,1 н раствора щелочи, мг;

K – поправочный коэффициент 0,1 н раствора гидроксида натрия;

10 – переводной коэффициент.

Обязательно проводят два параллельных определения и вычисляют среднюю величину с точностью до десятой.

5. Определение массовой доли белков в кормовых дрожжах методом формолового титрования

Метод заключается в блокировке свободных аминогрупп белков внесенным нейтрализованным формалином (формолом). Свободные карбоксильные группы белков, затем нейтрализуются щелочью. Количество щелочи, пошедшее на титрование карбоксильных групп, косвенно отражает массовую долю белков.

10 г дрожжей разводят в 90 мл дистиллированной воды и титруют в присутствии фенолфталеина 0,1 н раствором гидроксида натрия до появления слабой розовой окраски. Затем вносят 5 мл 40% нейтрализованного формалина и вновь проводят титрование 0,1н раствором гидроксида натрия до не исчезающей слабой розовой окраски. Количество щелочи, пошедшее на второе титрование (при первом титровании оно расходуется на нейтрализацию веществ, обусловливающих кислотность дрожжей), умножают на коэффициент 0,959 и получают массовую долю белков в дрожжах.

6. ***Метод определения крупности гранул***

Навеску продукта массой 100 г просеивают через сито прибора в течение 10 мин при 190-210 мин$^{-1}$. Допускается просеивать вручную при 110-210 мин$^{-1}$и размахе сита около 10 см. Продукт, прошедший через сито, или остаток на сите взвешивают (результат записывают с точностью до одного десятичного знака).

Затем с погрешностью не более 1 мм измеряют длину и диаметр 10 случайно отобранных гранул продукта.

Обработка результатов.

Проход через сито или остаток на сите выражают в процентном отношении массы продукта, прошедшего через сито или оставшегося на сите, к массе навески.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемое относительное расхождение между результатами параллельных определений не должно превышать 0,1%, а между результатами, полученными в разных лабораториях – 0,2%.

За размер гранул (диаметр и длину) принимают среднее арифметическое значение десяти измерений, которое округляют до целого числа.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные факторы перспективности производства биомассы с помощью микробного синтеза.
2. Что включает в себя понятие белок одноклеточных микроорганизмов?
3. Назовите сырьевые источники для синтеза микробного белка
4. Перечислите этапы технологической схемы получения кормовой биомассы.
5. По каким показателям оценивают качество кормовых дрожжей?

ТЕМА 6. МЕТОДЫ ТРАНСПЛАНАЦИИ ЭМБРИОНОВ

Трансплантация эмбрионов

Биотехнология имеет особое значение в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Крупный рогатый скот относится к одноплодным видам млекопитающих. От одной коровы можно получить в лучшем случае одного теленка в год. Однако в ее яичнике содержатся сотни тысяч незрелых половых клеток (ооцитов). Они представляют огромный генетический резерв. Ускорить воспроизводство скота можно при переходе к нетрадиционным способам увеличения плодовитости. В последнее время приобрела практическое значение трансплантация эмбрионов. Использование этого метода в сочетании с длительным хранением семени в замороженном состоянии позволяет получить десятки тысяч потомков от одного производителя в год и освободить генетически выдающихся самок от необходимости вынашивания плода и вскармливания потомства. Суть метода состоит в том, что самок стимулируют с целью увеличения выхода яйцеклеток,

которые затем извлекают на стадии ранних зародышей и пересаживают менее ценным в генетическом отношенииреципиентам.

Технология трансплантации эмбрионов включает следующие этапы:

Отбор доноров. В качестве коров-доноров отбирают матерей потенциальных племенных быков. На первом этапе племенная ценность донора оценивается по главным признакам молочного скота – по уровню молочной продуктивности и жирности молока. На втором этапе число признаков в зависимости от цели селекции расширяется (форма вымени и сосков, свойства молокоотдачи, резистентность, крепость костяка и копыт, тип и воспроизводительные качества). Предпочтение отдают коровам, которые сохранили в течение трех отелов стабильную воспроизводительную способность. От таких коров можно регулярно получать эмбрионы через каждые два месяца. У коров-доноров при всех отелах должны отсутствовать осложнения (мертворождаемость, задержание последа, послеродовые заболевания половых органов).

Вызывание суперовуляции. В группу доноров переводят только тех коров, которые положительно реагируют на введение гормонов. Для стимуляции множественной овуляции используют:

а) гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (СЖК) в сочетании с простагландинами и другими биологически активными веществами. Вводят однократно. Этот способ позволяет вызывать суперовуляцию примерно у 70 % коров;

б) фолликулостимулирующий гормон ФСГ или его комбинация с лютеинизирующим гормоном ЛГ в соотношении 5:1. Вводят многократно.

Оптимальный результат суперовуляции – выход из яичника в воронку яйцепровода 10 - 20 яйцеклеток. Эмбрионы можно получить менее чем от половины первоначально отобранных потенциальных коров-доноров. Хорошими донорами считают коров, которые после многократных

суперовуляций имеют хорошую реакцию яичника и производят большое число пригодных для пересадки эмбрионов за одно вымывание.

Кормление доноров должно быть таким, чтобы они находились в хорошем физиологическом состоянии. Рацион коровы-донора должен быть сбалансированным по основным питательным веществам, и особенно по аминокислотам и микроэлементам.

Искусственное осеменение коров-доноров. Для этого используют сперму только выдающихся быков-производителей, достоверно оцененных по качеству потомства. Коров осеменяют дважды: первый раз при начале появления половой охоты и второй – через 12 - 24 часа. Со дня осеменения начинается отсчет развития эмбрионов *in vitro*.

Извлечение эмбрионов. Возможно три способа:

1.Извлечение эмбриона после убоя коровы-донора – самый простой и надежный способ. Этот способ практиковался только на первых этапах освоения метода трансплантации. В настоящее время он не используется из-за потери генетически ценной коровы-донора.

2. Хирургический способ – эмбрионы извлекают между 7-8-ми сутками после первого искусственного осеменения (*разрез верхнего свода влагалища, лапаротомия по белой линии живота и лапаротомия в области голодной ямки*). Этот способ трудоемкий, дорогостоящий, им нельзя пользоваться многократно. В настоящее время применяется редко, главным образом в научныхцелях.

3. *Нехирургический способ.* Преимущество – простота манипуляций. Для этого не требуется специального операционного помещения. Эмбрионы можно извлекать непосредственно в производственных условиях. При правильном применении этого способа воспроизводительная способность доноров не нарушается. Это позволяет многократно использовать генетически ценных коров-доноров для получения от них большого числа потомков. Эмбрионы извлекают под местной анестезией путем вымывания (5 - 8 раз). Длительность манипуляции – 20 - 50 минут. После вымывания эмбрионов в матку вводят

раствор антибиотика. В среднем из вымытых яйцеклеток до 25 % оказываются неоплодотворенными или дезинтегрированными.

Кратковременное культивирование и хранение эмбрионов. Манипуляции с ранними эмбрионами, находящимися на предимплантационных стадиях развития, т.е. от момента их получения до введения в рога матки реципиента, занимают от 1 до 5 часов. В этот период нужно создать оптимальные условия, обеспечивающие сохранение их биологических качеств. Кратковременное хранение эмбрионов дает также возможность транспортировать их в другие хозяйства.

Эмбрионы КРС можно сохранить путем пересадки их в яйцепровод самок других видов млекопитающих, например, крольчих. Недостаток метода – трудоемкость и возможные потери зигот при их переносе.

В настоящее время распространен метод краткосрочного хранения эмбрионов *in vitro.* При этом жизнеспособные эмбрионы переносят в питательные среды с температурой 37 ºС. В состав сред включены растворы солей, аминокислоты с бикарбонатным ионом как буферным агентом. Он обеспечивает pH в пределах 7,2 - 7,6. При этом биологические качества эмбрионов сохраняются до 95 часов.

Оценка эмбрионов. Производится несколькими методами: **а)** Морфологический метод – при этом основное внимание обращают на форму зиготы, равномерность дробления и т.д. **б)** Оценка по адсорбционным свойствам оболочек и цитоплазмы к различным красителям (например, синьке Эванса). **в)** Гистохимические методы – основаны на специфических реакциях структурных элементов и веществ клеток к различным красителям.

При оценке качества эмбрионов в нашей стране принята 5-балльная шкала с учетом следующих показателей: соответствие стадии развития эмбриона его возрасту; правильность формы прозрачной оболочки и ее целостность; состояние цитоплазмы и др.

Идеальный эмбрион должен быть компактным, сферической формы, с однородной окраской, с клетками одинаковой величины и т.д. Эмбрионы с

замедленным развитием выбраковываются. Наиболее пригодными для трансплантации являются эмбрионы, которые извлечены из матки коровы-донора на 7 - 8 сутки после первого осеменения.

Пересадка эмбрионов реципиентам. В качестве реципиента отбирают гинекологически здоровых коров после двух-трех нормальных половых циклов; продуктивные, племенные и породные качества роли не играют. Основное условие хорошего приживления эмбрионов – синхронность проявления половой охоты у доноров и реципиентов.

В настоящее время пересадка эмбрионов реципиентам производится следующими способами:

- *хирургический способ* – эго эффективность 60 - 70 %, а число телят – 3 - 4 на донора. Этот способ использовали в основном до середины 70-х годов. Однако он требует больших затрат, его трудно применять в производственных условиях. Из-за возможных травм его нельзя многократного использовать.

- *нехирургический способ* прост, экономичен, возможно многократное использование реципиента. Разработано несколько способов нехирургической пересадки эмбрионов. Метод основан на введении эмбриона в рог матки через шейку. Аппликацию зародышей – 50 - 60%.

Эффективность трансплантации повышается при пересадке двух эмбрионов, по одному в каждый рог матки. Это позволяет получить двойные отелы. При пересадке двух эмбрионов в каждый рог матки частота двоен составляет 55 - 60 %, а при естественном многоплодии коров – всего 2 %. Также можно пересаживать эмбрион и оплодотворенной корове. При этом приживляемость эмбриона составляет 50 %.

Консервация эмбрионов. Самый эффективный метод – глубокое замораживание (криоконсервация) в жидком азоте при температуре - 196 ºС. Долговременное хранение глубокозамороженных эмбрионов имеет преимущества: **а)** пересадки могут быть проведены в любое время независимо от сроков взятия эмбрионов, поэтому нет необходимости в содержании больших групп реципиентов. В результате повышается рентабельность

трансплантации; **б)** возможно создание эмбриобанков от генетически ценных животных. Это важно для сохранения генофонда редких и исчезающих пород, при транспортировке эмбрионов.

Выживаемость эмбрионов составляет 90 %, а стельность коров-реципиентов после нехирургической пересадки находится 50 - 55 %.

Эмбрионы замораживают в пробирках 50×6 мм или в ампулах вместимостью 1 мл. В них вносят 1 - 4 эмбриона от одного донора и 0,4 мл раствора криопротектора (например, 10 % раствор глицерина). Затем ампулы запаивают на пламени газовой горелки.

Возможно два режима охлаждения: **1)** Ампулы или пробирки охлаждают с 20 до-6 ºС со скоростью 1 ºС в минуту, проводят кристаллизацию, охлаждение со скоростью 0,3ºС в минуту и погружают в жидкий азот. **2)** Охлаждение от -7 до -35 ºС со скоростью 0,3 ºС в минуту; от -35 до -38 ºС со скоростью 0,1 ºС в минуту и погружение в жидкий азот.

Оттаивание эмбрионов производится на водяной бане с температурой 25 или 37 ºС в течение 10-12 секунд.

Оплодотворение яйцеклеток вне организма животного

Разработка системы оплодотворения и обеспечения ранних стадий развития эмбрионов млекопитающих вне живого организма (*in vitro*) имеет большое значение для решения ряда научных задач и практических вопросов по повышению эффективности разведения животных.

Оплодотворение яйцеклеток млекопитающих in vitro включает следующие этапы:

1. *Созревание ооцитов in vitro*. Ооциты получают из яичников коровы после убоя животных. Яичники доставляют в лабораторию в термостатированном контейнере в течение 1,5 - 2 часов. Там их дважды промывают свежим фосфатным буфером. Ооциты извлекают из фолликулов путем отсасывания или разрезания яичников на пластинки. Ооциты собирают в

среду ТСМ 199 с добавлением 10 % сыворотки крови от коровы в охоте, затем дважды промывают и отбирают для дальнейшего созревания in vitro ооциты с компактным кумулюсом и однородной цитоплазмой.

В последнее время разработан способ прижизненного извлечения ооцитов из яичников коров с помощью ультразвукового прибора или лапароскопа. При этом ооциты отсасывают из фолликулов, диаметр которых не менее 2 мм, 1 - 2 раза в неделю от одного и того же животного. В среднем получают однократно 5-6 ооцитов на животное. Для созревания in vitro пригодно менее 50% ооцитов.

Отобранные ооциты созревают в течение 24 часов в среде ТСМ 199 с добавлением 20 % обработанной теплом сыворотки крови от коровы в охоте, гранулезных клеток и небольшого количества антибиотиков (пенициллина, стрептомицина).

2. *Капацитация сперматозоидов.* До того как сперматозоид приобретает способность к оплодотворению, в нем должны произойти некоторые физиологические изменения. Этот процесс получил названиекапацитация.

Капацитация включает две фазы: **1)** изменение мембраны спермия (собственно капацитация); **2)** акросомная реакция.

Разработаны следующие методы капацитации спермиев: использование среды с высокой ионной силой; использование гликозаминогликана гепарина.

3. Оплодотворение in vitro и обеспечение ранних стадий развития эмбрионов (на примере КРС). Оплодотворение *invitro*проводят в капле модифицированной среды Тироида. После созревания in vitro ооциты частично очищают от окружающих кумулюсных клеток и переносят в микрокапле по пять ооцитов в каждой. Суспензия сперматозоидов объемом 2 - 5 мкл добавляется к среде с ооцитами, чтобы достичь концентрации сперматозоидов в каплях 1,0-1,5 млн./мл. Через 44 - 48 часов после осеменения определяют наличие дробления ооцитов. Затем эмбрионы помещают в монослой эпителиальных клеток для дальнейшего развития в течение 5дней.

Межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных. Пересадка эмбрионов, например, овец козам и наоборот сопровождается их

приживляемостью, но не завершается рождением потомства. Во всех случаях межвидовых беременностей непосредственной причиной абортов является нарушение функции плаценты за счет иммунологической реакции материнского организма на инородные антигены плода. Эта несовместимость может быть преодолена получением химерных эмбрионов с помощью микрохирургии.

Клонирование животных

Ядро соматической клетки обладает полной генетической информацией о данном организме. Если создать условия для реализации этой информации, то можно получить неограниченное число генетических копий (клонов) определенной особи.

Получение однояйцовых близнецов – имеет большое значение для животноводства. При этом увеличивается выход телят от одного донора, появляются генетически идентичные двойни. Для этого эмбрионы млекопитающих на ранних стадиях развития разделяют микрохирургическим путем на две или более частей. Они в последующем развиваются в отдельный организм. Разделенные эмбрионы коров могут храниться в замороженном состоянии.

Клонирование эмбрионов путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные (лишенные ядра) яйцеклетки. Включает следующие этапы: выделение интактного ядра донора; энуклеация ооцита; пересадка ядра в энуклеированную яйцеклетку; активация ооцита и слияние мембран яйца и ооцита под действием электрического импульса.

Данная технология позволяет получить из отдельной эмбриональной клетки множественные копии генетически одинаковых животных (до 64). Повторное клонирование полученных этим методом эмбрионов повышает потенциальные возможности технологии в производстве большого числа клонов.

Клонирование животных путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки – метод позволяет получить не только одинаковых между собой животных, но и идентичных по генотипу с животными-донорами соматических клеток. Эта технология может быть использована для сохранения исчезающих пород животных.

Методы получения трансгенных животных

Трансгенными называют животных с измененной наследственностью, которая вызвана включением в их геном чужеродных генов с помощью следующих генно-инженерных методов:

Микроинъекции гена. Предварительно у животных гормональной обработкой вызывают суперовуляцию и проводят оплодотворение. Затем извлекают эмбрионы на стадии пронуклеуса хирургическим путем или после убоя доноров.

Для микроинъекции эмбрионов необходим стабильный рабочий стол, на который устанавливают микроскоп, два микроманипулятора для управления удерживающей и инъекционной пипетками и прибор для регулирования инъекционного давления. На столике микроскопа устанавливают инъекционную камеру со средой, покрытой парафиновым маслом. В среду помещают эмбрионы. Для инъекции эмбрионы по мере надобности посредством пониженного давления фиксируют на удерживающей пипетке так, чтобы инъецируемый пронуклеус был хорошо виден. Кончик инъекционной пипетки (внутренний диаметр около 1 мкм) наполняют раствором ДНК. О точности операции судят по набуханию пронуклеуса. После инъекции эмбрионы освобождаются от удерживающей пипетки и культивируют до момента пересадки реципиентам.

Так, в оплодотворенных яйцеклетках мыши или кролика пронуклеусы хорошо видны, их легко инъецировать. У эмбрионов сельскохозяйственных животных в цитоплазме имеются темные липидсодержащие гранулы. Они затрудняют визуализацию пронуклеусов. Поэтому предварительно проводят

центрифугирование. При этом гранулы смещаются к одному полюсу яйцеклетки и пронуклеусы становятся видимыми и доступными для микроинъекций.

Затем эмбрионы культивирования in vitro (до нескольких часов) и хирургически трансплантируют в яйцевод синхронизированных реципиентов.

Для образования трансгенных линий животных значение имеет получение таких трансгенных животных, у которых часть половых клеток содержат трансген. Возможно появление мозаик – животных, состоящих из двух или нескольких клеточных линий, происходящих от одной зиготы, но имеющих различные генотипы. Часть мозаиков не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Чтобы получить одно трансгенное животное, трансген которого был бы включен в геном животного, и оно было способно дать трансгенное потомство, необходимо не менее 100 беременностей после пересадки микроинъецированных эмбрионов.

Эффективность микроинъекций у крупных домашних животных очень низкая.

Пересадка трансфицированных ядер. При этом используются ядра клеток, отобранные на основе трансгенной интеграции, то есть пересаживаются только трансгенные эмбрионы. Поэтому любой новорожденный организм будет трансгенным. Последующая селекция трансгенных эмбрионов не требуется.

Использование сперматозоидов в качестве векторов экзогенного ДНК. При этом сперматозоиды могут быть взяты от одного самца и пересажены в семенники самца того же или другого вида. Там они становятся функционирующими.

Контрольные вопросы

1. Значение трансплантации эмбрионов для животноводства.

2. Перечислите основные этапы технологии трансплантации эмбрионов.

3. Требования, предъявляемые к коровам-донорам икоровам-реципиентам.

4. Техника вызывания суперовуляции и искусственное осеменениекоров-доноров.

5. Способы извлеченияэмбрионов.

6. Оценкаэмбрионов.

7. Способы пересадки эмбрионовреципиентам.

8. Консервацияэмбрионов.

9. Технология оплодотворения яйцеклеток млекопитающих *invitro.*

10. Межвидовые пересадкиэмбрионов.

11. Методы клонированияживотных.

12. Каких животных называют трансгенными?

13. Методы получения трансгенных животных.

ТЕМА 7. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГМО В КОРМОВЫХ СРЕДСТВАХ И ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В настоящее время численность людей на планете составляет 7 млрд. человек. К 2030 году ожидается рост до 8 млрд., поэтому даже индустриально развитые страны могут ощутить недостаток продуктов питания, что приводит к постоянному росту цен на продовольствие. Одним из решений данной проблемы стало создание генетически модифицированных или трансгенных продуктов. Метод генных модификаций позволяет перенести ценные гены от одного объекта в другой на уровне ДНК, независимо от видовой

принадлежности, и создать принципиально новые сорта растений с конкретно заданными свойствами.

Генетически модифицированный организм (ГМО) – это организм, генотип которого был искусственно изменен при помощи методов генной инженерии. Это определение может применяться для растений, животных и микроорганизмов. Генетические изменения, как правило, производятся в научных или хозяйственных целях.

Существуют различные мнения о безопасности генетически модифицированных организмов (ГМО) расходятся. Одни исследователи считают, что генномодифицированный организм безвреден, по мнению других, он является источником биологических и экологических рисков для человека, животных и окружающей среды (Baker B., 1999) (56).

Вместе с приобретением нового признака ГМ-продукт получает и целый набор новых качеств, опосредованных как плейотропным действием экспрессируемых белков, так и влиянием самой встроенной конструкции, на регуляторные механизмы соседних генов.

Непредсказуемость встраивания измененной конструкции в чужеродный геном является одним из недостатков генно-инженерных методов. Встроенный ген может оказывать влияние на окружающие его гены В следствие этого появляется вероятность изменения процессов транскрипции и трансляции, приводящая к экспрессии новых белков, как, например, токсинов или аллергенов (53,130,62,122,152, 59,71,90,102,159).

Наличие в трансгенной конструкции фрагментов ДНК, кодирующих устойчивость к антибиотикам можетпривестиг к нежелательным последствиям (68). Некоторые риски могут быть связаны с пролонгированным действием и проявляться через поколения (15).

Для регулирования оборота ГМО принят Картахенский договор, к которому присоединились уже более 180 стран. В различных странах разработаны планы мониторинга продукции на содержание ГМО (10, 72, 122).

ЕС разработал Директивы о маркировке пищевых продуктов, полученных из ГМО, а также стандарты по методам их контроля (7, 8). В то же время в США маркировка ГМ продуктов питания не является обязательной.

В Российской Федерации разрешено к применению несколько видов растений, полученных с применением трансгенных технологий: 6 линий кукурузы, 3 линии сои, 3 сорта картофеля, 1 линия сахарной свеклы, 1 линия риса.

С целью регулирования оборота и контроля ГМИ принят ряд законодательных актов (20, 28, 29, 30, 31, 36, 48, 49). Постановлением главного государственного санитарного врача Российской федерации установлен пороговый уровень для маркировки продукции, полученной из ГМИ, которая равняется 0,9 %.

Продукция, полученная из ГМИ и впервые реализующаяся в России, подлежит обязательной санитарно-эпидемиологической экспертизе (3).

Несмотря на различия в законодательствах относительно безопасности ГМО и необходимости маркировки в разных странах мира, включая РФ, определение ГМО в продукции является неотъемлемой мерой в связи с принципами технического регулирования. В соответствии с Федеральным законом «О техническом регулировании» продукция должна соответствовать требованиям технических регламентов и стандартов. Определение компонентного состава продукции, в том числе и ГМО, является важным элементом при подтверждении соответствия и препятствует введению в заблуждение потребителя.

Согласно поправке к Федеральному закону РФ «О защите прав потребителя», вступившей в силу в 2005 году, продукты питания, содержащие ГМО, подлежат обязательной маркировке вне зависимости от процентного содержания компонентов.

Определение ГМО в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, проводят по белку или нуклеиновым кислотам. Для этого применяют качественный и количественный анализ. В настоящее

время известны стандарты и методические указания по методам определения ГМО. Качественное определение: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводится в соответствии с ГОСТ Р 52173-2003, МУК 4.2.1902-04 (5, 22). Метод идентификации с применением биологического микрочипа проводится в соответствии с ГОСТ Р 52174-2003 (б). Иммуноферментный анализ проводится в соответствии с МУК 4.2.1913-04 (21). Количественное определение: ПЦР в реальном времени проводится в соответствии с МУК 4.2.1913-04 (21). Иммуноферментный анализ проводится в соответствии с МУК 4.2.1913-04 (21). Исследование продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов (ГММ), проводиться в соответствии с МУ 2.3.2.1935-04 (7).

Существует множество различных весьма чувствительных и специфичных способов определения ГМО в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения (151). Для идентификации используется три объекта, по которым можно судить о наличии ГМИ. Этими объектами являются: 1) встроенный чужеродный ген и фланкирующие вспомогательные последовательности; 2) мРНК, матрица для синтеза модифицированного белка; 3) синтезируемый трансгенный белок.

В последние годы в мире значительно увеличилось производство и импорт трансгенной продукции. За десять лет коммерческого использования ГМ-культур объемы потребления, в частности модифицированной сои, составили: в России – 300 тысяч тонн, в странах ЕС - 50 миллионов тонн, в США - 500 миллионов тонн. В связи с этим увеличивается вероятность поступления пищевой продукции, полученной из ГМИ (генетически модифицированных источников), или содержащей их компоненты, на внутренний рынок России. ГМ соя и кукуруза также являются одними из основных источников белка при кормлении животных. Вследствие чего их добавляют в состав кормосмесей, комбикормов, кормовых добавок, заменителей цельного молока для телят, а также в состав сухого корма и консервов для домашних животных и птиц.

Безопасность пищевых продуктов и в том числе контроль и мониторинг продукции и кормов, содержащих ГМО, поступающих в последние годы в Россию в большом количестве, является важной государственной задачей. Во многом это определяется активным присутствием на рынке импортных пищевых продуктов, и особенно, сырьевых растительных компонентов, количество которых в будущем, вероятно, будет увеличиваться. В сентябре 2011 года вступил в силу Технический регламент «Требования к безопасности пищевой продукции, полученной из генно-модифицированных (трансгенных) растений и животных», по которому необходимо обязательно маркировать продукцию, как содержащую ГМО, если его процентное количество превышает 0,9%.

В настоящее время рынок пищевых продуктов и кормов в России на наличие ГМО не контролируется. Проблема распространения генетически модифицированных объектов в Казахстане требует создания теоретической базы, разработки соответствующих методов и критериев оценки, интеграции с другими областями знаний.

1. Принцип метода определения ГМО

Генодиагностика трансгенных растений и животных позволяет выявить целевой ген, «встроенный» в ДНК организма-хозяина с целью получения нового признака, недостижимого для данного организма с помощью селекции или требующего многие годы работы селекционеров для изменения их свойств.

При конструировании ГМО выявлены наиболее часто употребляемые селективные трансгены: это регуляторные и маркерные векторные последовательности, свидетельствующие о произведенных генетических модификациях. В качестве последовательностей регуляторных векторных генов используются полилинкеры, промоторы (P-35S) или терминаторы (TNOS), а также последовательности мигрирующих элементов, представленные на рисунке 5.

P-35S	ТРАНСГЕН	T-NOS

Рисунок 5 – Схематическое изображение целевой генетической конструкции ГМО

Генетическая конструкция при создании генетически модифицированных организмов обязательно включает в себя промоторную область, трансген, определяющий новое свойство, и терминаторную область. Количество трансгенных линий сои и кукурузы, которые можно обнаружить в ГМ-продуктах с помощью методов детекции 35S-промотора составлет приблизительно 92%. Учитывая, что скрининговая процедура детекции ГМО не связана с оценкой безопасности анализируемых продуктов, а предназначена исключительно для информирования потребителей, то эти показатели следует рассматривать как очень высокие [2].

Изучение ДНК-технологии, находящейся в основе создания ГМО, привело к разработке специфичных и чувствительных методов их детектирования. Для определения наличия или отсутствия в пищевом продукте ГМО нужно выявить изменения в ДНК или установить наличие новых белков, синтезированных в ходе генетической модификации. Выделенный белок подвергают иммунохимическому анализу, а выделенную ДНК качественно или количественно анализируют методом полимеразной цепной реакции. Для обнаружения ГМО проводят исследования на наличие трансгенов (чужеродных генов), регуляторных или маркерных векторных последовательностей. Наличие таких последовательностей свидетельствует о произведенных генетических модификациях.

Метод выявления ГМО в сырье и пищевых продуктах растительного и животного происхождения, кормах и кормовых добавках основан на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов методом горизонтального электрофореза или в режиме реального времени. Методы детектирования ГМО, основанные на ПЦР-анализе, разделяются на несколько уровней специфичности:

- методы скрининговые, применяемые в качестве первой проверки присутствия некоторых генетических элементов, которые в настоящее время являются общими для многих используемых для коммерческих целей ГМ растений (промоторы, терминаторы и гены-маркеры);

- методы структурно-специфические, ставящие своей целью искусственное объединение двух элементов ДНК, таких как промотор и трнсген;

- методы специфического превращения, использующие для распознавания ГМО в более сложных и некоторых особых случаях.

Из-за высокой чувствительности и специфичности при ПЦРдиагностике происходит экспоненциальное увеличение специфических фрагментов ДНК, таким образом этот метод является передовой аналитической технологией для анализа ГМО. Специфичность ПЦР основывается на связывании коротких олигонуклеотидов (праймеров) с концевыми областями отрезка ДНК, относящегося к специфической генетической модификации. Методы, основанные на ПЦР, позволяют определять даже следы специфических последовательностей в ДНК.

Существующие на сегодняшний день методы обнаружения ГМО, в основном это метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-реал-тайм) и с применением биологического микрочипа требуют специального дорогостоящего оборудования и реактивов.

Скрининговые методы предназначены для того, чтобы на первом этапе проверки оценить, содержит или нет продукт, вероятно содержащий материал, являющийся производным ГМО, трансгенную ДНК. Качественные методы определения ДНК промотора дают однозначно положительный или отрицательный ответ на присутствие генетически модифицированной ДНК в изучаемом образце.

2. Общие требования к проведению ПЦР-анализа

Проведение исследований методом ПЦР допускается при условии организации в лаборатории самостоятельных рабочих зон, соответствующих

этапам ПЦР-анализа. ПЦР-лаборатория должна включать следующий минимальный набор рабочих зон:

- приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала;
- выделения ДНК;
- приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР;
- детекции продуктов амплификации методом электрофореза.

В зоне выделения ДНК располагают ПЦР-бокс или бокс биологической безопасности. В ПЦР-боксе для выделения ДНК не допускается проведение других видов работ! Помещение для приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР должно быть отдельным. Приготовление реакционных ПЦР-смесей проводят в ПЦР-боксе. Зона детекции продуктов амплификации методом электрофореза должна быть максимально удалена от зон выделения ДНК и приготовления смеси реакции.

Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Перед началом работы рабочую поверхность столов обрабатывают 70% этиловым спиртом и облучают ультрафиолетовым излучением не менее 10 минут.

Для того чтобы избежать аэрозольного загрязнения пипеток, использовать только наконечники с антиаэрозольными барьерами. Во время проведения манипуляций на вортексе штативы для наконечников должны быть закрыты крышками.

По окончании работ рабочие поверхности, дозаторы, вортекс, термостат, центрифугу обрабатывают растворами (0.1% раствор ДП-2Т с экспозицией 30 минут, 0,5% р-р HCL, р-р DNA-ZAP, с последующей протиркой влажными тампонами для снятия остатков дезинфицирующего средства) и облучают ультрафиолетовым излучением не менее 10 минут.

Пробирки с продуктами ПЦР и использованные наконечники к микродозаторам подвергаются первичной обработке растворами, вызывающими деградацию ДНК.

3. Отбор и подготовка проб

Отбор проб проводят в соответствии с методическими документами, устанавливающими порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-2000, 10852-86, 13979.0-86, 26313-84, 26312.1-84, 9792-73, 7631-85.

От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:

- от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5 - 10 г) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20 х 30 см с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50 - 100 г);

- из общей пробы отбирают среднюю пробу в 10 - 20 г, помещают в полиэтиленовый пакет с застежкой-молнией размером не более 10 х 15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотныйполиэтиленовый пакет размером 20 х 30 см, опечатывают и отправляют на анализ.

От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу весом 10 - 50 г в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с застежкоймолнией размером не более 10 х 15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96%-ном этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, опечатывают и отправляют на анализ.

Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 $см^3$, опечатывают и отправляют на анализ.

При отборе проб составляют акт отбора проб, который вместе с отобранной пробой отправляют в лабораторию. Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и

пестики, предварительно обработанные хромовой смесью, и фламбированные инструменты – пинцеты, скальпели, ножницы.

Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 3 - 5 г и растирают пестиком до гомогенного состояния.

Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 3 - 5 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до гомогенного состояния.

Пробы продуктов консистенции крахмала весом 100-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 $см^3$ физиологического раствора. Для анализа необходимо 50-150 $мм^3$ образца.

Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими микродозаторами с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50-150 мкл образца.

Из полученных гомогенатов и суспензий проводят выделение ДНК. Для этого нужно перенести 20 мг измельченного образца в соответствующий эппендорф и сразу же закрыть пробирку. Для отрицательного контроля добавить 1 мл воды. Добавить 400 мкл реагента PrepmanUltra в каждую пробирку. Закрыть пробирку. Тщательно перемешать пробирку с образцом и реагентом PrepmanUltra на вортексе. Поместить пробирки в термостат на 95-100ºС на 10 минут.

Затем центрифугировать при 14000 об/мин в течение 5-х минут. Аккуратно перенести 30-50 мкл супернатанта в соответствующую пробирку. Образец ДНК может храниться при 4ºС до одного месяца. В случае необходимости хранения образца ДНК на более длительный срок, использовать морозильник - 20 ºС.

4. Определение ГМО растительного происхождения

При сравнении и анализе регуляторных векторных генов, использующихся для создания генетически модифицированных организмов, был проведен подбор нуклеотидных последовательностей и конструирование

прямого и обратного праймеров на основе регуляторной 35S промоторной последовательности.

Важным, с экономической точки зрения является использование метода обнаружения последовательности ДНК только промотора 35S вируса мозаики цветной капусты без параллельного обнаружения последовательности терминатора NOS.

Для первичного скрининга ГМО в кормах и животноводческой продукции отобраны 2 наиболее перспективных праймера: праймер на регуляторную 35S промоторную область генетической модификации, характерной для подавляющего большинства ГМО, и на растительную ДНК в качестве внутреннего контроля ПЦР, представляющего matKпраймер – ДНК маркер хлоропластов растений.

Для идентификации ДНК растительного происхождения используются ДНК-маркеры хлоропластной ДНК в отличие от митохондриальной ДНК, использующейся для штрихкодирования животных. В качестве праймеров для штрихкодирования растительной ДНК используются ДНК маркеры хлоропластов, в отличие от митохондриальной ДНК для животных, что связано с низким уровнем изменчивости. Для детекции растительных материалов или продуктов и кормов для животных на их основе использовался универсальный matKпраймерхлоропластной ДНК растения Pinusthunbergii (СоснаТунберга). ПраймерmatK является универсальным праймером для амплификации ДНК некодирующего района хлоропластов большой таксономической области различных видов растений. Он используется в качестве маркера в популяционной биологии, при изучении эволюции растений, внутри и межвидовой филогении.

С использованием отобранных праймеров отработаны условия проведения полимеразной цепной реакции. Оптимальная концентрация праймеров - 1 мМ, dDNTP – четырех вида дезоксинуклеозидтрифосфатов до 0,2 мМ, добавляли Tag полимеразу до 5 единиц активности, концентрация Mg Cl2, необходимого для работы полимеразы, составила 1,5 мМ.

Таблица 1 - Параметры проведения ПЦР

Этапы амплификации	Режим амплификации		Процесс	Число циклов
	Температура, ºС	Время, с		
1	94	300	Денатурация ДНК	1
2	94	20	Денатурация ДНК	35
	60-68	40	Отжиг праймеров	
	72	60	Синтез ДНК	
3	72	300	Финальная элонгация	1

Как видно из таблицы, для лучшего связывания праймеров с матричной ДНК использовали градиент температур отжига парймеров от 60 до 68 ºС. Денатурацию ДНК проводили при 94 ºС в течение 5 минут. На стадии элонгации нами была использована Tag полимераза, которая активна при оптимальной температуре равной 72 оС. Досинтез цепей проводили при температуре 72 °С в течение 5 минут. Денатурация ДНК и доращивание цепи осуществлялись за один цикл амплификации, а полимеразная цепная реакция проводилась в 35 циклов.

ПЦР-реакции ставили в объеме 25 мкл. Вносили по 7,5 мкл воды деионизованной, 10 мкл ПЦР реакционной смеси 2,5х, 1,5 мкл 25 мМ раствора MgCl2, по 0,5 мкл праймеров прямых и обратных, 5 мкл ДНК (50- 100 нг).

5. Электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле

Присутствие продуктов ПЦР определяют путем регистрации методом электрофореза [9]. После проведения ПЦР по 5 мкл продуктов амплификации наносят на агарозный гель. Пробы ДНК смешивают (1:5) с буфером для нанесения образца, содержащим в конечной концентрации 30 % глицерина или 40% сахарозы, 0,025 % краситель БФС (бромфеноловый синий) и 0,25% ксилолцианол.

Для проведения горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле используют электродный ТВЕ (трисборатный) буфер, состоящий из 0,089М Трис, 0,089М борной кислоты и 0,002М ЭДТА. Трисборатный буфер обеспечивает хорошее разделение фрагментов ДНК и имеет высокую буферную емкость. В буфер добавляют бромистый этидий до 0,5 мкг/мл для детекции нуклеиновых кислот. Используют 1,7% агарозный гель, толщиной около 0,6см. Движение ДНК осуществляется от отрицательного электрода к положительному. Электродный буфер заливают в камеру сверху геля на высоту 1-5 мм. Электрофорез проводят в течение 25 минут при оптимальной напряженности электрического поля 10 В/см. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290- 330 нм.

Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. По окончании электрофоретического разделения вынимают гель из формы и просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью УФ трансиллюминатора. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

Гели анализируют и фотографируют под ультрафиолетом в трансиллюминаторе. Наличие двух фрагментов ДНК на агарозном геле свидетельствует о наличии ГМО растительного происхождения.

Контрольные вопросы:

1. Что включает в себя понятие ГМО?
2. В чем заключается принцип метода определения ГМО?
3. Перечислите риски возможного потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека.
4. Перечислите общие требования к проведению ПЦР-анализа?
5. Как проводят отбор и подготовка проб для ПЦР-анализа?
6. Назовите методы обнаружения ГМО.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Источники информации	Кол-во экз.
Биотехнология в животноводстве : учебное пособие / В. Ф. Красота [и др.]. - М. : Колос, 1994. - 127 с. : ил.	89
Биотехнология: Учебник для вузов. Доп. Мин.сельского хоз-ва РФ/ Тихонов И.В. и др.; Под ред.Е.С.Воронина.-СПб.:ГИОРД,2005.-792с.	22
. Микробная биотехнология [Текст] / И. Б. Лещинская [и др.] ; ред. И. Б. Лещинская ; Министерство образования Российской Федерации, Казанский государственный университет, Академия наук Республики Татарстан. - Казань : Унипресс: ДАС, 2000. - 368 с.	9
Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.	http://cit.ksavm.senet.ru/biblio/
Музафаров, Е.Н. История и география биотехнологий [Электронный ресурс] : учебное пособие / Е.Н. Музафаров. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — 344 с.	https://e.lanbook.com/book/101843.
Мезенова, О.Я. Биотехнология рационального использования гидробионтов [Электронный ресурс] : учебник / О.Я. Мезенова. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2013. — 416 с.	https://e.lanbook.com/book/13096.
Мишанин, Ю.Ф. Биотехнология рациональной переработки животного сырья [Электронный ресурс] : учебное пособие / Ю.Ф. Мишанин. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2017. — 720 с.	https://e.lanbook.com/book/96860

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Антипова, Л.В. Прикладная биотехнология: учебное пособие / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, А.И. Жаринов. – Воронеж: Участок оперативной полиграфии ВГТА, 2000. – 332 с.

2. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под. ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493- 1236-2

3. Биотехнология кормопроизводства и переработки отходов / Отв. ред. М.Е. Беккер. – Рига: Зинатне, 1987. – 213 с.

4. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн. / Под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М.: Высшая школа, 1987.

5. Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции (К 100-летию СГАУ имени Н.И. Вавилова). – Саратов: Издательство «КУБиК», 2013. – 286 с.

6. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.

7. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.

8. Блинов, В.А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2

9. Блинов, В.А. ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.

10. Воронин, В.И. Биотехнология / В.И. Воронин – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.

11. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995.

12. Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К.

Горбатова. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 278 с.

13. Ермишин, А.П., Холмецкая, М.О. Некоторые организационные и методические подходы повышения эффективности детекции генетически модифицированных составляющих в пищевых продуктах // Тез.докл. конф./под ред. Н.А.Жагоры. – Минск: БелГИМ, 2008, С. 101-104.

14. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.

15. Марченко, Г.Г. Гибридизация животных / Г.Г. Марченко, О.И. Бирюков, Т.С. Преображенская. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2008. – 84 с.

16. Микробная биотехнология / И.Б. Лещинская [и др.]. – Казань: Унипресс, 2000. – 368 с.

17. Никитина, Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4

18. Никульников, В.С. Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретинин. – М.: Колос, 2007. – 544 с.

19. Общая биотехнология: методические указания к лабораторным работам / сост.: В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «РИК «Полиграфия Поволжья», 2004. – С. 58-60.

20. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологии продуктов питания и кормов. – М: 2012. – 443 с.

21. Петухова, Е.В. Пищевая микробиология: Учебное пособие / Е.В. Петухова, А.Ю. Крыницкая, З.А. Канарская. – Казань, Изд-во КНИТУ, 2014. – 115 с.

22. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология: в 4 кн. Кн.1. Основы пищевой биотехнологии. / И.А Рогов. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.

23. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. [и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с.

24. Сироткин, А.С. Теоретические основы биотехнологии: Учебно-методическое пособие / А.С. Сироткин, В.Б. Жукова. – Казань: Изд-во КГТУ, 2010. – 87 с.

25. Сироткин, А.С. Общая биотехнология/ А.С. Сироткин, Р.К. Закиров, В.Б. Жукова. – Казань: Изд-во КГТУ, 2007. – 104 с.

26. Фаритов, Т.А. Корма и кормовые добавки для животных: учебное пособие / Т.А. Фаритов. – СПб.: Лань, 2010. – 304 с. – ISBN 978-5-8114-1026-2

27. Фисинин, В.И. Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник / В.И. Фасинин, И.А. Егоров, И.Ф. Драганов. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 344 с.

28. Шишков, В.Н. Современная биотехнология в ветеринарной медицине / В.Н. Шишков [и др.]. – М., 1988.

29. Шнеер, В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журнал общей биологии. -2009. - № 4.- С. 296-315.

30. Heinze, B. A database of PCR primers for the chloroplasts genomes of higher plants // Plant Molecular Biology.- 1991.- V.17.Issue 5. -P. 1105-1109.

31. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Methods, 2007.3:4 doi: 10 1186/1746-4811. P.3-4.

32. Wang, X-R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., Szmidt, A. E. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (Pinus, Pinaceae) based on chloroplast rbcl, matK, rpl20-rps18 spacer, and tmV intron sequences // American Journal of Botany, 1999. V.86. P. 1742-1753.

33. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn. G., and Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // Erlich Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 1986. 51:263-273. 9 Маниатис, Т., Фритч, Э., Сэмбрук, Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // М.: Мир, 1984. С. 159-172.

Нормативно-правовая литература:

34. Технический регламент «Требования к безопасности пищевой продукции, полученной из генно-модифицированных (трансгенных) растений и животных», Постановление Правительства Республики Казахстан от 21 сентября 2010 года.

35. ГОСТ Р 53244 – 2008 (ИСО 21570:2005) Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов.

36. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с. (ссылка доступа – http://www.nacles.ru/ftpgetfile.php?id=247)

37. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с. (ссылка доступа – http://www.biorosinfo.ru/papers-society/ Strategy _ Bioindustry.pdf)

38. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с. (ссылка доступа – http://sedi2.esteri.it/Sitiweb/AmbMosca/Pubblicazioni/ Faldoni/ biotecnologierus.pdf)

39. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» – http://www.cbio.ru

40. http://www.biotechnolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Введение 3
Раздел I. Теоретические основы биотехнологии 5

Тема 1. Правила работы в лаборатории. Подготовка посуды, питательных сред для микробного синтеза 5

Практическая работа № 1. Характеристика и приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов 11

Тема 2. Влияние разных режимов стерилизации на гибель микроорганизмов. Оценка качества продуктов, полученных методом стерилизации 13

Практическая работа № 2. Влияние разных режимов стерилизации на гибель микроорганизмов 16

Тема 3. Культивирование микроорганизмов 20

Практическая работа № 3. Изучение кинетики роста дрожжей при глубинной ферментации 27

Тема 4. Изучение ферментативной активности ферментных кормовых добавок 33

Практическая работа № 4. Исследование амилолитической и осахаривающей активности ферментных препаратов 42

Раздел II. Применение биотехнологии в животноводстве 46

Тема 5. Получение кормового белка 46

Практическая работа № 5. Определение качественных показателей кормовых дрожжей 51

Тема 6. Методы трансплантации эмбрионов 56

Тема 7. Методы определения гмо в кормовых средствах и продуктах животного происхождения 66

Список рекомендуемой литературы 80

Список литературы 81