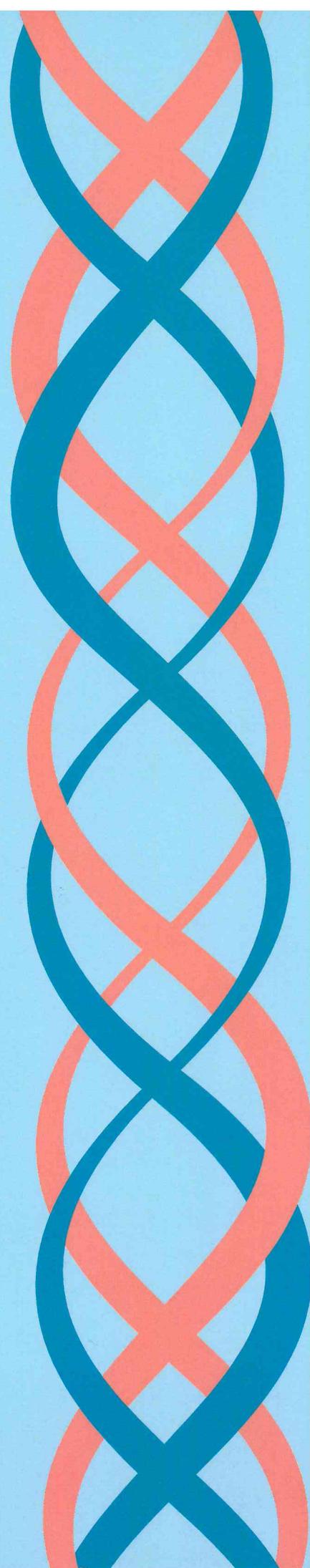




**РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ**  
для лабораторных занятий  
по дисциплине

# **ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ**

**Сост. Ю. Ю. Филиппова**



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Челябинский государственный университет»  
Биологический факультет  
Кафедра микробиологии, иммунологии и общей биологии

**РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ**  
**для лабораторных занятий по дисциплине**  
**«ВВЕДЕНИЕ В BIOTEХНОЛОГИЮ»**

2-е издание, переработанное и дополненное

Студента (тки)  
биологического факультета  
группы \_\_\_\_\_  
Ф. И. О. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

УДК 60(075.8)

ББК Ж600я7

P134

Одобрено на заседании кафедры микробиологии, иммунологии  
и общей биологии биологического факультета  
Челябинского государственного университета

**Рабочая тетрадь для лабораторных занятий по дисциплине «Введение в биотехнологию»** / сост. Ю. Ю. Филиппова. — Челябинск : Издательство Челябинского государственного университета, 2019. — 72 с.

Рабочая тетрадь содержит методики выполнения практических и лабораторных работ, а также вопросы для самостоятельной подготовки по основным разделам рабочей программы дисциплины «Введение в биотехнологию». Рассматриваются темы: «Пищевая биотехнология», «Фармацевтическая биотехнология», «Инженерная энзимология», «Промышленная биотехнология» и «Биотехнологии в охране окружающей среды».

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению 06.03.01 — «Биология» (бакалавриат) всех профилей подготовки.

УДК 60(075.8)

ББК Ж600.6я73-5

**Составитель** кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии *Ю. Ю. Филиппова*

**Рецензент** кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии *Т. А. Головина*

© Челябинский государственный университет, 2017

© Филиппова Ю. Ю., составление, 2017

© Челябинский государственный университет, 2019

© Филиппова Ю. Ю., составление, 2019

# ОГЛАВЛЕНИЕ

---

1. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА	
<b>Основные направления современной биотехнологии.</b>	
<b>Знакомство с работой в лаборатории биотехнологии.....</b>	<b>5</b>
2. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА	
<b>Биотехнология промышленных производств.....</b>	<b>10</b>
3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Приготовление и методы оценки качества питательных сред ....</b>	<b>12</b>
4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Виды брожений. Спиртовое брожение.</b>	
<b>Уксуснокислое брожение.....</b>	<b>17</b>
5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Виды брожений. Молочнокислое брожение.</b>	
<b>Определение кислотности молока.....</b>	<b>22</b>
6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Иммобилизация биокатализаторов включением</b>	
<b>в гели. Включение клеток дрожжей в гели агара.....</b>	<b>26</b>
7. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Получение микроорганизмов — продуцентов амилаз .....</b>	<b>29</b>
8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Определение амилалитической активности штаммов —</b>	
<b>продуцентов амилаз .....</b>	<b>31</b>
9. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА	
<b>Биотехнологии в охране окружающей среды .....</b>	<b>35</b>
10. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Периодическое культивирование <i>S. cerevisiae</i></b>	
<b>в лабораторном ферментере.....</b>	<b>37</b>

11. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Количественное определение аскорбиновой кислоты</b>	
<b>в различных объектах.....</b>	<b>42</b>
12. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Изучение защитного действия криопротекторов</b>	
<b>на устойчивость растительных клеток к действию</b>	
<b>низких температур.....</b>	<b>45</b>
13. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Выделение и определение концентрации ДНК .....</b>	<b>49</b>
14. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Определение содержания основных пигментов</b>	
<b>фотосинтетического аппарата в листьях высших растений .....</b>	<b>53</b>
15. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА	
<b>Определение токсичности проб воды и снега</b>	
<b>на основе измерений интенсивности свечения</b>	
<b>реагента «Энзимолум».....</b>	<b>59</b>
16. ЗАДАЧИ К ИТОГОВОМУ КОЛЛОКВИУМУ .....	<b>63</b>
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	<b>66</b>
ПРИЛОЖЕНИЯ	
Приложение 1. Правила оформления реферативных сообщений.....	<b>67</b>
Приложение 2. План доклада и критерии оценки	
к практической работе по теме «Биотехнология	
промышленных производств».....	<b>70</b>
Приложение 3. Методика окрашивания мазков по Граму .....	<b>71</b>
Приложение 4. План доклада и критерии оценки	
к практической работе по теме «Биотехнологии в охране	
окружающей среды» .....	<b>72</b>

# 1. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

## Основные направления современной биотехнологии.

### Знакомство с работой в лаборатории биотехнологии

---

**Цель:** получить представления о биотехнологии как науке.

**Задачи:**

1. Познакомиться с основными направлениями современной биотехнологии.
2. Получить инструктаж по технике безопасности проведения работ в лаборатории биотехнологии.
3. Просмотреть фильм «Можно ли жить вечно?».
4. Выполнить задания к практической работе.

**Задание 1.** *Прочитайте инструктаж по технике безопасности при работе в лаборатории биотехнологии, ответьте на контрольные вопросы.*

Техника безопасности при работе в лаборатории биотехнологии

**Общие сведения:**

- для ознакомления с правилами безопасного проведения работ организуется проведение инструктажа по технике безопасности. Результаты инструктажа заносятся в специальный журнал;
- запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, без сменной обуви или бахил. Для хранения верхней одежды предназначен общий гардероб;
- запрещается размещать на рабочих местах посторонние предметы (сумки, пакеты, предметы одежды, сотовые телефоны, планшеты и т. д.);
- запрещается пробовать на вкус любые реактивы и расходные материалы, пить, есть и курить в лаборатории;
- **о возникновении ЛЮБЫХ аварийных ситуаций необходимо сообщать преподавателю или старшему лаборанту;**
- в качестве спецодежды в лаборатории используются лабораторные халаты. Халаты должны быть достаточно длинными и застегиваться полностью, при этом быть закрытыми спереди. Рукава должны плотно охватывать запястья;
- перед началом работы собрать распущенные волосы в хвост или под медицинскую шапочку, повреждения кожи на руках, если таковые имеются, заклеить лейкопластырем или надеть напальчник.

### **Правила работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности:**

- работу с учебными культурами проводить только в лотках;
- просмотренные стекла с мазками микроорганизмов, использованные накопечники и Пастеровские пипетки помещать в емкости с дезинфицирующим раствором;
- по окончании работы все объекты, содержащие ПБА, должны быть убраны в хранилища (холодильники, термостаты, шкафы и т. д.);
- после работы дежурный в присутствии старшего лаборанта должен слить жидкие отходы в слив, обеззаразить слив дезинфицирующим средством. Слив необеззараженных жидкостей в канализационную сеть запрещается;
- остатки ПБА, использованная посуда, твердые отходы должны собираться в закрывающиеся емкости и передаваться в автоклавную или дезинфицироваться на месте;
- в обязательном порядке проводится дезинфекция рабочих поверхностей столов.

### **Правила работы с химическими реактивами:**

- вся посуда, содержащая реактивы и готовые реагенты, должна быть маркирована соответствующими этикетками;
- при работе с едкими веществами необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты (перчатки, защитные очки);
- все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу;
- все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу;
- при пролитии едких веществ следует немедленно засыпать пролитое вещество сухим песком, удалить его и тщательно промыть место разлива водой;
- при работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин и др.) нельзя определять вещество по запаху, так как может произойти отравление их парами;
- **запрещается приливать воду к кислоте!;**
- наливать или насыпать реактивы следует только над специальной клеенкой на столе;
- пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол салфеткой с дезинфицирующим раствором;
- не загрязнять реактивы во время работы: не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы;
- набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой и ни в коем случае не путать их;
- **избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку;**

- внимательно следить за тем, чтобы реактивы (особенно кислоты и щелочи) не попадали на лицо, руки и одежду;
- в случае попадания на кожу концентрированной кислоты, пораженное место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды
- при попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно обмыть сначала разбавленной кислотой, а потом водой.

### **Правила работы с нагревательными приборами:**

- при эксплуатации приборов и аппаратов следует руководствоваться инструкциями и правилами, изложенными в их техническом паспорте и руководстве по эксплуатации;
- недопустимо оставлять во включенном состоянии без присмотра электронагревательные приборы, за исключением тех, что по своему назначению и конструкции предназначены для круглосуточной работы;
- в пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более  $\frac{1}{3}$  объема пробирки;
- во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять их отверстия на себя или других людей. Нельзя заглядывать сверху в открыто нагреваемые сосуды во избежание возможных травм при выбросе горячей массы из сосуда;
- перед тем как зажечь спиртовку необходимо убедиться, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.);
- вначале пробирку с раствором нужно прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки;
- нельзя нагревать пробирку долго в одном месте, так как жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки;
- после нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком;
- закончив работу, необходимо привести рабочее место в порядок и провести дезинфекцию рабочих поверхностей столов.

*Ответьте на следующие вопросы:*

1. Можно ли сливать необеззараженные жидкости в канализационный слив?

Ответ обоснуйте.

---

---

---

---

---

2. Перечислите порядок действий при попадании на кожу концентрированной кислоты.

---

---

---

---

3. Перечислите все средства индивидуальной защиты (СИЗ), необходимые при работе в лаборатории биотехнологии.

---

---

---

---

4. Укажите правильный порядок, ответ обоснуйте:

- а) приливают кислоту в воду;
- б) воду в кислоту;
- в) нет разницы.

---

---

---

---

---

---

5. При нагревании жидкость в пробирке должна занимать:

- а)  $\frac{1}{2}$  объема;
- б)  $\frac{1}{3}$  объема;
- в) допустим любой объем жидкости.

6. При возникновении аварийной ситуации:

- а) устранять ее последствия самостоятельно, если авария небольшая;
- б) сообщать только об авариях на своем рабочем столе;
- в) о любых авариях сообщать преподавателю или старшему лаборанту;
- г) не обращать внимания на аварию и продолжать работу.

**Задание 2.** *Просмотрите фильм «Можно ли жить вечно?» и запишите биологические технологии, показанные в фильме и их существующие прототипы.*

---

---

---

---

---

---

---

---

**Домашнее задание.** *Подготовьте реферативное сообщение и доклад с презентацией на следующие темы (продолжительность доклада — 10 минут).*

- Основы промышленного пивоварения/виноделия.
- Промышленное производство рекомбинантного инсулина/антибиотиков.
- Промышленное получение аминокислот на основе иммобилизованных ферментов / Получение микробных препаратов — удобрений, стимуляторов и регуляторов роста растений.
- Получение микробных биопластиков / Добыча золота с помощью бактерий.
- Принципы получения биотоплива из микроорганизмов/растений: реалии и перспективы.

Правила оформления реферативного сообщения, план доклада и критерии оценки представлены в **Приложениях 1, 2.**



3. Перечислите основные этапы технологического процесса получения аминокислот на основе иммобилизованных ферментов/ препаратов удобрений.

4. В каких сферах деятельности применяются микробные биопластики/золото в ионной форме?

5. Каковы перспективы получения биотоплива из микроорганизмов/ растений?

### 3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

## Приготовление и методы оценки качества питательных сред

---

---

**Цель:** познакомиться с методами приготовления и контроля качества питательных сред.

**Задачи:**

1. Изучить требования, предъявляемые к питательным средам.
2. Получить представление о физико-химических методах оценки качества питательных сред.
3. Познакомится с методами биологического контроля качества сред.
4. Освоить стадии приготовления мясо-пептонного бульона (МПБ) и метод определения концентрации аминного азота в питательных средах и полуфабрикатах.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

**Основные сведения о питательных средах**

Различные питательные среды используют для выделения, выращивания и длительного сохранения микроорганизмов в культурах.

**Требования, предъявляемые к средам:**

- 1) должны содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей микроорганизмов. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;
- 2) должны иметь оптимальную концентрацию водородных ионов — рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества. Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена;
- 3) должны быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5 % раствору хлорида натрия;





7. 2 мл полученного мясо-пептонного бульона налить в химическую пробирку, провести определение содержания аминного азота.
8. Остальной бульон перелить во флакон на 100 мл, отдать на стерилизацию.
9. Сделать заключение по работе. Рассчитать концентрацию (в %) NaCl в питательной среде.

**Задание 4.** *Оцените концентрацию аминного азота в среде МПБ методом формольного титрования (метод Серенсена).*

**Материалы и оборудование:** среда МПБ, 1,5N NaOH, 40 % раствор формальдегида, фенолфталеин, химические пробирки, градуированные пробирки.

Концентрация аминного азота — важная характеристика питательных сред, т. к. показывает количество азота, которое доступно для усвоения бактериями. **Аминный азот ( $\text{NH}_2$ )** — это суммарный азот аминокислот и низших полипептидов. В среде для культивирования большинства микроорганизмов должно содержаться не менее **0,8—1,2 г/л аминного азота**.

Определение содержания аминного азота в питательных средах проводят методом формольного титрования. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминокислотных групп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп.

**Ход работы:**

1. В первую пробирку налить 2 мл исследуемой среды (МПБ), во вторую пробирку налить 2 мл 40 % формальдегида.
2. В каждую пробирку добавить 1—2 капли фенолфталеина.
3. Для нейтрализации растворов до pH 7,0 (формальдегид) и 9,0 (МПБ) соответственно, титровать каждый раствор 1,5N NaOH до появления слабо розового окрашивания (записать количество потраченного NaOH).
4. Соединить исследуемую среду с раствором 40 % формальдегида.
5. Если после соединения жидкостей произошло обесцвечивание раствора, продолжить титровать смесь 1,5N NaOH до появления слабо розового окрашивания (записать количество потраченного NaOH).
6. Сложить значения количества NaOH, пошедшего на титрование МПБ, формальдегида и смеси веществ.







**Задание 2.** *Опишите морфологию и культуральные свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.*

---

---

---

---

---

---

---

---

---

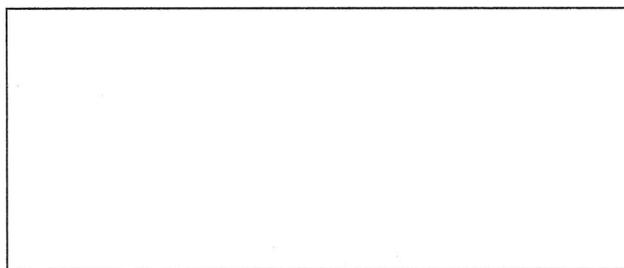
---

**Задание 3.** *Проведите качественную реакцию на спиртовое брожение, зарисуйте морфологию возбудителя спиртового брожения.*

**Материалы и оборудование:** раствор бродящей жидкости, 10 % раствор едкого натра, йод кристаллический, петли микробиологические, набор для окрашивания по Граму (р-р Люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги), предметные стекла, спиртовки, стакан на 100 мл, штатив, 2 цилиндрические пробирки, мерная пробирка.

**Ход работы:**

1. В 2 пробирки (1 — с завинчивающейся крышкой, 1 — химическая) налить по 5 мл раствора бродящей жидкости.
2. Первую пробирку (с завинчивающейся крышкой) использовать для обнаружения возбудителя спиртового брожения:
  - а) центрифугировать пробирку 5 минут при 1,5 тыс. об/мин.;
  - б) надосадок слить в слив, из осадка приготовить мазок, окрасить по Грамму (**Приложение 3**);
  - в) микроскопировать мазок при увеличении 90× (масляная иммерсия).
3. Вторую пробирку использовать для проведения качественной реакции с кристаллическим йодом:
  - а) к 5 мл бродящей жидкости добавить 1 мл концентрированного раствора 10-процентной щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения (60 °С);
  - б) добавить несколько кристалликов йода и снова нагреть. В присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, имеющий характерный запах.
4. Зарисовать морфологию возбудителя спиртового брожения, подписать род/вид выделенного микроорганизма.







# 5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

## Виды брожений.

### Молочнокислое брожение.

#### Определение кислотности молока

---

---

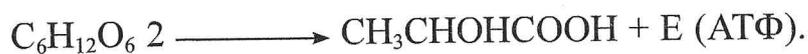
**Цель:** знакомство с биохимическими основами процесса молочнокислого брожения, с методами обнаружения микроорганизмов-возбудителей этого вида брожения и способами определения кислотности молока.

**Задачи:**

1. Познакомиться с химизмом молочнокислого брожения.
2. Изучить морфологию представителей гомо- и гетероферментативного брожения.
3. Освоить метод определения общего количества бифидобактерий в кисло-молочных продуктах.
4. Освоить метод определения кислотности молока по Тернеру.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

**Биохимические основы молочнокислого брожения**

Молочнокислое брожение вызывается микроорганизмами, которые с помощью фермента — лактазы сбраживают молочный сахар (лактозу) или другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов.



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на 2 группы: гомоферментативные, продуктом разложения которых является молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты,  $CO_2$  и др.

**Задание 1.** *Опишите морфологию и применение 3—4 представителей гомоферментативного и гетероферментативного брожения.*

---

---

---

---

---

---

---

---

**Задание 2.** *Определите общее количество бифидобактерий в кисломолочном продукте.*

**Материалы и оборудование:** пробирки со средой для бифидобактерий, дозаторы, стерильные наконечники, спиртовка, термостат, стерильные цилиндрические пробирки, физраствор, стерильные Пастеровские пипетки, пробы молочнокислых продуктов.

**Ход работы:** все работы проводить над пламенем горелки!

1. Записать название продукта, дату изготовления, дату окончания срока годности, количество искомых микроорганизмов на конец срока годности;
2. Обработать упаковку исследуемого кисломолочного продукта спиртовым шариком, аккуратно вскрыть;
3. В пять стерильных пробирок стерильной Пастеровской пипеткой налить по 9 мл физиологического раствора;
4. Приготовить серию разведений кисломолочного продукта: 1:10; 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, для этого:
  - а) в первую пробирку Пастеровской пипеткой к 9 мл физ. раствора прилить 1 мл исследуемого продукта, пипетку замочить в дез. растворе; взять новую пипетку, тщательно перемешать суспензию,
  - б) этой же пипеткой отобрать 1 мл во вторую пробирку, пипетку замочить в дез. растворе; взять новую пипетку, тщательно перемешать суспензию, повторить операцию еще 3 раза.
5. С помощью дозатора со стерильным наконечником забрать 10 мкл суспензии из каждого разведения и посеять уколом в среду для бифидобактерий, наконечник сбросить в дез. раствор.

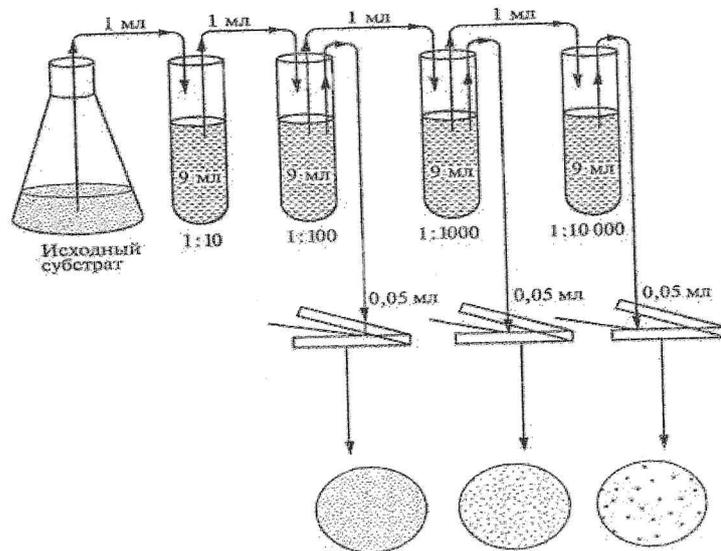


Схема титрования микроорганизмов

6. Инкубировать микроорганизмы при температуре 37 °С в течение 48—72 часов.
7. Определить количество исследуемых бактерий в кисломолочном продукте. Сделать заключение о соответствии полученного вами количество микроорганизмов заявленному производителем на конец срока годности. Записать название нормативного документа, регламентирующего проведение оценки качества кисломолочных продуктов.

---



---



---



---



---



---



---



---

**Задание 3.** Проведите определение кислотности молока.

**Материалы и оборудование:** свежее и кисломолочный продукт, 0,1N раствор NaOH, раствор фенолфталеина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, мерные пробирки.

**Ход работы:**

1. В 2 колбы на 50 мл налить 10 мл свежего молока (контрольная проба) и исследуемого кисломолочного продукта (опытная проба), добавить по 20 мл дистиллированной воды и 2—3 капли фенолфталеина, тщательно перемешать.
2. Смесь оттитровать 0,1N раствором NaOH до появления слабо розовой окраски индикатора.
3. Рассчитать кислотность в градусах Тернера.



## 6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Иммобилизация биокатализаторов включением в гели.

#### Включение клеток дрожжей в гели агар

---

---

**Цель:** научиться получать иммобилизованные биокатализаторы включением клеток дрожжей в агарозные гели.

**Задачи:**

1. Познакомиться с методами иммобилизации клеток.
2. Рассмотреть способы получения и физические свойства агар-агара и свойства носителей, используемых для иммобилизации клеток.
3. Освоить метод иммобилизации клеток дрожжей в гели агара.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

С целью наиболее выгодного применения в биотехнологии клеток микроорганизмов, растений и животных широко используется технология закрепления клеток на или в нерастворимом носителе — иммобилизация. Одним из методов иммобилизации клеток является включение их в полимерные гели. Гель — это такое состояние системы полимер — растворитель, когда макромолекулы полимера соединены в пространственную сетку при помощи достаточно устойчивых связей. Чтобы получить гель с включенными в него клетками, необходимо суспендировать биомассу в растворе гелеобразователей и затем создать условия перехода системы в студенообразное состояние. В результате клетки оказываются окруженными пространственной сеткой набухшего сшитого химическими или физическими связями полимера. Через эту сетку к клеткам происходят поступление субстратов из внешней среды и отвод метаболитов.

Для иммобилизации клеток чаще используются полисахариды: агар-агар, каррагинан, альгинаты и т. д. Благодаря наличию в гидрофильных молекулах полисахаридов большего числа электронодонорных и электронноакцепторных групп для этих соединений основным типом межмолекулярных нековалентных контактов, ответственных за формирование узлов сетки геля, является водородное связывание и в меньшей степени — гидрофобные и дисперсионные взаимодействия.

**Задание 1.** *Охарактеризуйте способы получения и физико-химические свойства агар-агара.*

---

---

---

---

**Задание 2.** Перечислите носители, используемые для иммобилизации клеток. Назовите преимущества и недостатки иммобилизованных клеток.

**Задание 3.** Рассчитайте количество  $\text{NaCl}$ , необходимое для получения 50 мл 3-х молярного раствора.

**Задание 4.** Проведите иммобилизацию клеток дрожжей в гели агара.  
**Материалы и оборудование:** дрожжи, 0,9 % раствор  $\text{NaCl}$ , термостат, стакан на 50 мл, весы, сухой агар, водяная баня, шприц, 3М раствор хлористого натрия, бумажный фильтр, колба на 50 мл, 10 % раствор глюкозы.





### Ход работы:

*Получение накопительной культуры сенной палочки (Bacillus subtilis).*

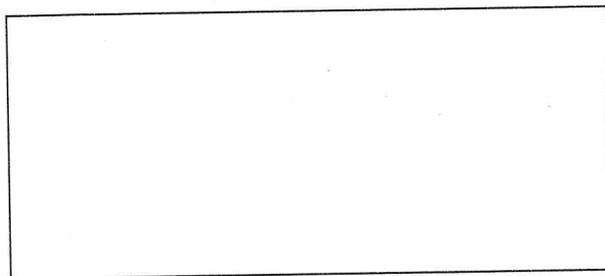
1. Мелко нарезанное сено (1 г) залить 20 мл теплой водопроводной воды, тщательно перемешать, настоять в течение 20 минут.
2. Полученный таким образом экстракт отфильтровать в стакан, 3—4 мл перелить в пробирку, пробирку закрыть ватно-марлевой пробкой и выдержать на кипящей водяной бане в течение 10 мин.

*Определение морфологических и культуральных признаков полученных культур.*

3. 100 мкл остывшего фильтрата налить в центр чашки Петри, содержащей плотную питательную среду МПА с 1% крахмалом.
4. С помощью микробиологической петли тщательно растереть жидкость по поверхности чашки. Чашку поместить в термостат при температуре 35—37 °С на 2—3 суток для образования колоний микроорганизмов.

*Определение штаммов, обладающих амилолитической активностью.*

5. Поверхность среды МПА с крахмалом, на которой выросли колонии, залить раствором Люголя. Крахмал, содержащийся в среде, окрашивается в синий цвет. Если микроорганизм обладает амилолитической активностью, то вокруг соответствующей колонии образуется зона просветления среды. Чем больше ширина зоны, тем выше амилолитические свойства культуры.
6. Выбрать колонию, обладающую самыми выраженными амилолитическими свойствами, описать морфологию колонии, сделать мазок, окрасить по Грамму (**Приложение 3**), микроскопировать с увеличением 90×, зарисовать морфологию микроорганизмов — продуцентов амилаз.



7. Колонию пересеять на жидкую питательную среду МПБ с 1 % крахмалом, убрать в термостат, использовать для лабораторной работы «определение амилолитической активности штаммов — продуцентов амилаз».

8. Сделать заключение по работе.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## 8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Определение амилолитической активности штаммов — продуцентов амилаз

---

**Цель:** научиться определять активность амилаз микроорганизмов *Bacillus subtilis* колориметрическим методом.

**Задачи:**

1. Изучить классификацию ферментов амилаз, тип катализируемой ими реакции, свойства амилолитических ферментов и их применением в биотехнологии.
2. Освоить колориметрический метод определения амилолитической активности ферментов *Bacillus subtilis*.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

Ферменты, или энзимы, — это катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах.

Происхождение терминов связано с тем, что первоначально ферментативные процессы были открыты и изучены в бродильном производстве. Ферментами (от лат. *psn. fermentum* — закваска) называли «организованные ферменты» (т. е. сами живые микроорганизмы), а термин энзим (от греч. *en* — в и *zyme* — закваска) был предложен в 1876 г. В. Кюне для «неорганизованных ферментов», секретлируемых клетками желудка или кишечника. Через два года после смерти Л. Пастера (1897 г.) Э. Бюхнер опубликовал работу «Спиртовое брожение без дрожжевых клеток», в которой экспериментально показал, что бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же, как и неразрушенные дрожжевые клетки. В 1907 г. за эту работу он был удостоен Нобелевской премии.

#### Классификация ферментов

Классификация ферментов основана на механизме их действия и включает 6 классов. Деление внутри классов основано на более подробной характеристике катализируемой реакции и ее субстратной специфичности. Каждый фермент имеет тривиальное и систематическое название, а также кодовый номер (шифр).



5. Смеси быстро перемешать и выдержать в водяной бане 10 минут.
6. Из контрольного и опытного растворов отобрать по 1 мл раствора и перенести их в пробирки с 5 мл рабочего раствора йода. Содержимое пробирок перемешать. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный — синюю, опытный — фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала.
7. Непосредственно после смешивания растворов определить их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре (ФЭК), используя светофильтр с максимумом светопропускания при  $\lambda = 656$  нм (650—670 нм).
8. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.
9. Оптическая плотность контрольного раствора  $D_1$  соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора  $D_2$  соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата. Количество гидролизованного крахмала  $C$  (в граммах) определяют по формуле

$$C = 0,1 \times (D_1 - D_2) / D_1,$$

где 0,1 — количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

10. Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления. Если в результате ферментативной реакции количество превращенного крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчета амилолитической активности.
11. Амилолитическую активность  $AC$  (ед/мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле

$$AC = (5,885 \times c + 0,001671) \times 1000 / n,$$

где 5,885 и 0,001671 — коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 час действия фермента);  $c$  — количество прогидролизованного крахмала, г; 1000 — коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;  $n$  — количество ферментного препарата (культуральной жидкости), взятое для испытания, мг или мл.





---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

3. Во что на современных заводах по переработке мусора превращают использованный пластик?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

4. Какие вещества являются основными загрязнителями атмосферного воздуха в России?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

5. Какой самый распространенный способ использования карьеров, образовавшихся после добычи полезных ископаемых?

## 10. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Периодическое культивирование *S. cerevisiae* в лабораторном ферментере

**Цель:** научиться культивировать микроорганизмы в лабораторном ферментере, определять фазы и удельную скорость роста микроорганизмов.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с периодическим методом культивирования микроорганизмов и областью его применения.
2. Рассмотреть схему и основные узлы ферментера для периодического культивирования микроорганизмов на примере ферментера ВЛБИО-М.
3. Освоить метод ферментации *S. cerevisiae* в лабораторном ферментере.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

#### Периодический метод культивирования микроорганизмов

Процесс периодического культивирования *Saccharomyces cerevisiae* осуществляют в лабораторном ферментере (рабочий объем 1 л), оснащенным барботером (обеспечивающим аэрацию питательной среды) и нагревательным прибором, позволяющем поддерживать оптимальную температуру культивирования.

Периодическая культура представляет собой популяцию клеток в ограниченном объеме среды. В среду в процессе культивирования не добавляются питательные вещества и не удаляются продукты метаболизма. Рост популяции микроорганизмов в такой замкнутой системе характеризуется специфической S-образной кривой. Она описывает зависимость логарифма числа живых клеток от времени культивирования.



1. **Фаза приспособления**, или так называемая фаза адаптации микроорганизмов, или **лаг-фаза**. В этой фазе нет деления и соответственно роста

микроорганизмов, но происходит активация биохимических ферментов, белков и нуклеиновых кислот.

2. **Логарифмическая фаза роста** (экспоненциальная кривая), когда компонентов питания достаточно и биообъект полностью адаптирован к условиям в ферментере. Все клетки находятся в состоянии активного размножения, численность их возрастает в геометрической прогрессии. Скорость их роста является постоянной и максимальной — она зависит от физиологических особенностей вида и состава питательной среды.
3. **Стационарная фаза** в ней устанавливается равновесие между числом жизнеспособных и отмирающих клеток, скорость роста в этот период равна нулю. Количество живых клеток в среде остается некоторое время практически неизменным. Концентрация биомассы достигает практически своего максимума.
4. **Фаза замедленного роста клеток.** Из-за большой плотности популяции возникает пространственная ограниченность, ухудшается поступление в клетку питательных веществ и вывод продуктов метаболизма, уменьшается поверхность контакта клеток со средой. При этом часть клеток погибает.
5. **Фаза гибели клеток** по мере уменьшения числа жизнеспособных клеток и наступления аутолиза, популяция переходит в фазу отмирания, для нее характерно, что отмирание клеток преобладает над размножением. В данной фазе возможен критический рост, т. е. рост одних клеток за счет продуктов других клеток. Скорость отмирания популяции изменяется в широких пределах. Она зависит от видовых особенностей культуры и от условий культивирования в периодической системе.

Наиболее важными параметрами, которые характеризуют рост популяции в периодической культуре, являются: прирост биомассы и удельная скорость роста.

**Прирост биомассы** определяется как разность между количеством биомассы, полученной в стационарной фазе и количеством посевного материала.

**Удельная скорость роста** — показывает прирост единицы биомассы в единицу времени.

**Задание 1.** *Напишите области применения периодического метода культивирования в промышленности. Чем он принципиально отличается от непрерывного метода культивирования?*

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Задание 2.** Нарисуйте схему ферментера для периодического культивирования микроорганизмов, подпишите основные рабочие узлы.

**Задание 3.** Проведите ферментацию *S. cerevisiae* в лабораторном ферментере, нарисуйте кривую роста микроорганизмов, рассчитайте удельную скорость роста микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** ферментер, спектрофотометр, среда МПБ, среда МПБ с суточной культурой *S. cerevisiae*, шприц для внесения культуры.

**Ход работы: Работать в перчатках!!!**

1. Открыть кран подачи воды в рубашку (для охлаждения ферментера).
2. Включить ферментер, подняв вверх тумблер «Power», расположенный на передней панели блока управления. Проконтролировать повышение температуры внутри ферментера до 37 °С.
3. С помощью ротаметра установить скорость подачи воздуха 20 л/мин.
4. Включить мешалку, с помощью ручки-регулятора установить скорость вращения мешалки 200 об/мин.
5. Произвести внесение посевного материала в ферментер:
  - а) над пламенем горелки стерильным шприцем собрать суточную культуру *S. cerevisiae* из 2 пробирок (общий объём — 10 мл);
  - б) окунуть трубочку для засева культуры в стакан со спиртом, БЫСТРО снять зажим и внести (впрыскиванием) посевной материал в ферментер, надеть зажим.
6. Через 2—3 минуты провести отбор пробы из ферментера для определения начальной концентрации микроорганизмов в среде:
  - а) открыть зажим на трубке около пробоотборника, надеть зажим на трубку около барботера;
  - б) 2—3 раза сжать трубку около пробоотборника, чтобы выдуть старую среду из пробоотборника;
  - в) открыть зажим на трубке около баночки для отбора проб, набрать воздух в шприц, подведенный к баночке для отбора, при этом среда должна набраться в баночку;
  - г) надеть зажим на трубку, ведущую к баночке для отбора проб, снять зажим с трубки для слива среды;
  - д) выдуть воздух из шприца в баночку для отбора проб, при этом среда из баночки должна поступить в сливную трубку, надеть зажим на сливную трубку.
7. Измерить начальную концентрацию *S. cerevisiae* (оптическую плотность культуры) в посевном материале на спектрофотометре:
  - а) включить спектрофотометр «BioPhotometer» в сеть, выбрать программу для измерения оптической плотности микроорганизмов (OD 600);
  - б) в кювету для спектрофотометра налить 200 мкл Фосфатно-солевого буфера (ФСБ), поместить кювету с буфером в кюветный отсек, нажать на кнопку «Blank», дождаться появления в центре экрана значения «0,00»;
  - в) слить ФСБ из кюветы, в кювету налить 200 мкл культуральной жидкости, поместить кювету с образцом в кюветный отсек, измерить оптическую



# 11. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

## Количественное определение аскорбиновой кислоты в различных объектах

**Цель:** познакомиться с методами качественного и количественного определения аскорбиновой кислоты в различных объектах.

**Задачи:**

1. Рассмотреть способы получения аскорбиновой кислоты (витамина С) в биотехнологическом производстве.
2. Освоить метод Тильманса для количественного определения аскорбиновой кислоты в различных объектах.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

Витамин С (аскорбиновая кислота) является одним из важнейших факторов питания. Суточная потребность в витамине С для человека составляет 75 мг. Недостаток или отсутствие витамина С в пище в течение продолжительного времени приводит к тяжелому заболеванию, известному под названием цинги.

Аскорбиновая кислота весьма нестойка и легко окисляется на воздухе. Нагревание ускоряет окисление (разрушение) витамина С. В таблице приведено содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах.

Наименование продуктов	Количество аскорбиновой кислоты в мг на 10 г сырого продукта
Шиповник сухой очищенный	от 120 до 25 000
Смородина черная	100 — 400
Хвоя ели, сосны	150 — 250
Надпочечники быка (кора)	150 — 190
Петрушка (зелень)	100
Лимон	40
Капуста белокочанная	25 — 66
Молоко кобылье и кумыс	20 — 30
Картофель	6 — 17
Молоко женское	3 — 5

Витамин С участвует в окислительно-восстановительных процессах. Имеются предположения, что витамин С участвует в реакциях гидроксирования пролина и лизина при синтезе коллагена, синтезе гормонов коры надпочечников (кортикостероидов), аминокислоты триптофана и, возможно, в других реакциях гидроксирования. Имеются доказательства о необходимости участия витамина С в окислительном распаде тирозина и гемоглобина в тканях.

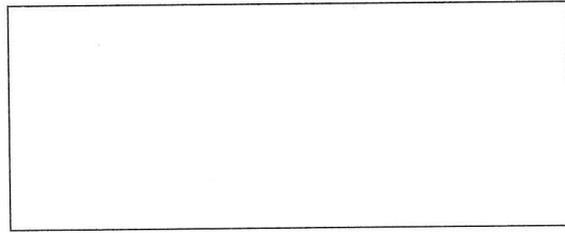






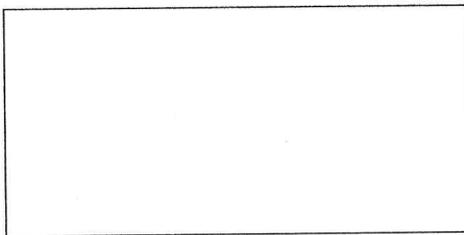


3. Пробирки на 25 мин поместить в охлаждающую смесь (лёд с солью).
4. Приготовить микропрепарат среза корнеплода свеклы, рассмотреть под микроскопом (увеличение  $10\times$ ), зарисовать клеточное строение корнеплода свеклы (наблюдаем равномерное окрашивание всех клеток).

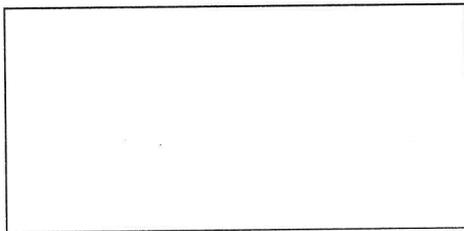


5. Вынуть пробирки из охлаждающей смеси. Перед размораживанием пронаблюдать окрашивание раствора в пробирках.
6. Разморозить растворы в стакане воды комнатной температуры.
7. Микроскопировать пластинки корнеплодов свеклы из растворов криопротекторов (увеличение  $10\times$ ).

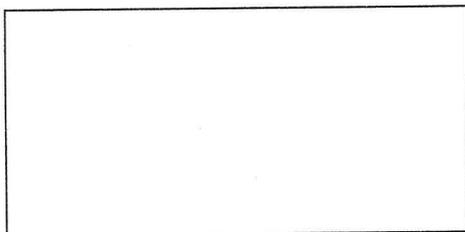
**Дистиллированная вода**



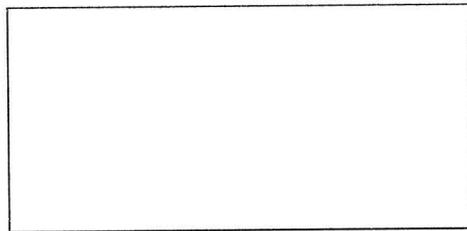
**1 М раствор сахарозы**



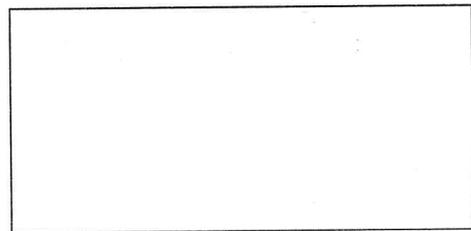
**1 М раствор глицерина**



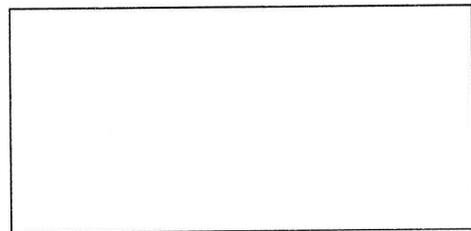
**1 М раствор сахарозы с водой**



**1 М раствор глицерина с водой**



**1 М раствор сахарозы/глицерина**

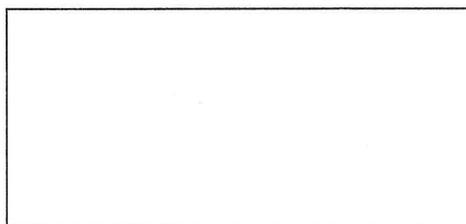


8. В каждом препарате посчитать % окрашенных клеток. Результаты занести в таблицу.

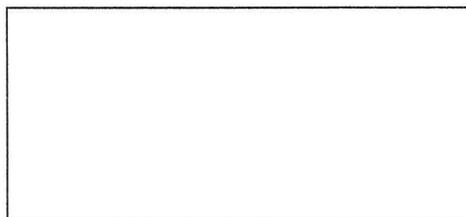
№	Раствор	Количество окрашенных клеток, %
1	5 мл дистиллированной воды	
2	2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды	
3	5 мл 1 М раствора сахарозы	
4	2,5 мл 1 М раствора глицерина и 2,5 мл воды	
5	5 мл 1 М раствора глицерина	
6	2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл 1 М раствора глицерина	

9. Для проверки жизнеспособности клеток провести плазмолиз. Для чего тонкие срезы анализируемого материала поместить на 10 минут в 8 % раствор NaCl. Затем препарат рассмотреть под микроскопом (увеличение 40×).

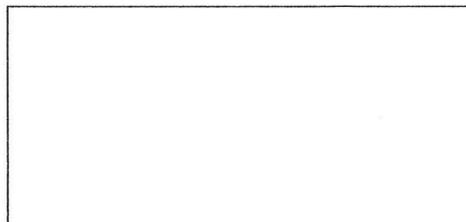
Дистиллированная вода



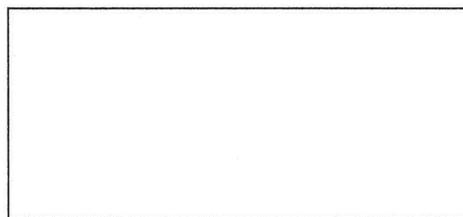
1 М раствор сахарозы



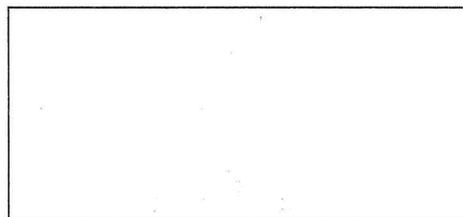
1 М раствор глицерина



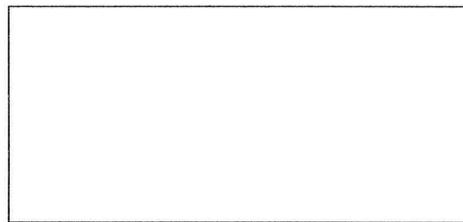
1 М раствор сахарозы с водой



1 М раствор глицерина с водой



1 М раствор сахарозы/глицерина



10. Сделать заключение по работе. Какое вещество из изученных является наиболее эффективным криопротектором.

---



---



---



---



---



---



---

# 13. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

## Выделение и определение концентрации ДНК

---

**Цель:** познакомиться с методом фенольно-хлороформного выделения ДНК из клеток *S. cerevisiae* и определить концентрацию выделенного продукта с помощью спектрофотометра.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с принципом и основными этапами выделения ДНК.
2. Изучить принципы выделения ДНК методом электрофореза в агарозном геле.
3. Освоить фенольно-хлороформный метод выделения ДНК из клеток *S. cerevisiae*.
4. Определить концентрацию выделенной ДНК с помощью спектрофотометра «BioPhotometer».
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

### Основные сведения о выделении ДНК

Процедура выделения ДНК из клеток и тканей часто является исходным этапом в исследовании живого организма на молекулярном уровне. От ДНК напрямую или через белки-ферменты зависят все биосинтезы и катаболизм клетки. Клетку необходимо разрушить тем или иным способом, а хромосомную ДНК очистить от других клеточных компонентов. Прежде всего, нужно отделить ДНК от белков, входящих в состав нуклеопротеидных комплексов хроматина. При этом важно защитить ДНК от действия нуклеаз и максимально сохранить её целостность, поскольку длинные линейные молекулы ДНК при их изоляции из клетки неизбежно фрагментируются.

Методы выделения ДНК обычно включают следующие этапы:

- 1) лизис клеток (или разрушение физическим, механическим способом);
- 2) ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;
- 3) центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов клеточных органелл.
- 4) осаждение ДНК из раствора этанолом и растворение осадка в буферном растворе.

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия. Для экстракции ДНК — смесь фенола-хлороформа. Ряд современных методов предусматривает сорбцию ДНК на гранулах силикагеля, центрифугирование и последующую элюцию ДНК с гранул в раствор. Другими



7. В суспензии клеток добавить 600 мкл изопропанола, перемешать перевертыванием пробирки 3 раза, центрифугировать в течение 10 минут при 4 °С, 10 тыс. об/мин.
8. Осторожно с помощью дозатора удалить супернатант в слив, к осадку добавить 300 мкл ТЕ буфера, ресуспендировать.
9. Быстро перенести полученный раствор в эппендорф с 200 мкл хлороформа, эппендорф закрыть, смесь перемешать перевертыванием до образования стойкой эмульсии, инкубировать 5 мин. при н.у. Центрифугировать 10 минут при 4 °С, 10 тыс. об/мин.
10. Верхний водный слой, содержащий ДНК (до белесого кольца белков) перенести дозатором в чистую 1,5 мл пробирку типа эппендорф.
11. Добавить в пробирку с ДНК 500 мкл изопропанола, перемешать, инкубировать 5 мин. при н.у., центрифугировать 5 мин. при 4 °С, 10 тыс. об/мин.
12. ДНК в виде белых нитей располагается на дне пробирки. Осторожно удалить ½ надосадка в слив, к осадку добавить 500 мкл 80 % этилового спирта, перемешать с помощью дозатора, центрифугировать 5 мин. при 4 °С, 10 тыс. об/мин.
13. Аккуратно удалить весь спирт с помощью дозатора, осадок высушить «на воздухе» при открытой крышке эппендорфа.
14. К осадку добавить 50 мкл ТЕ-буфера, перемешать, измерить концентрацию ДНК на спектрофотометре.

**Задание 3.** Измерьте концентрацию ДНК, выделенной из *S. cerevisiae* с помощью спектрофотометра «BioPhotometer».

**Материалы и оборудование:** спектрофотометр, кюветы к нему, фосфатный буфер, ДНК.

**Ход работы:**

1. Включить спектрофотометр в сеть, выбрать программу для измерения двух цепочечной ДНК (dsDNA).
2. В кювету для спектрофотометра налить 180 мкл фосфатного буфера, поставить в кюветный отсек спектрофотометра, нажать кнопку «Blank». На экране в центре появится значение 0.000.
3. Вытащить кювету, осторожно добавить в нее 20 мкл раствора ДНК, перемешать.
4. Ввести в спектрофотометр разведение ДНК: нажать кнопку «Dilution», ввести количество образца (20 мкл), нажать кнопку «Enter», ввести количество растворителя (180 мкл), нажать кнопку «Enter».
5. Поместить кювету с образцом в кюветный отсек, измерить концентрацию выделенной ДНК, нажав кнопку «Sample». В центре — значение ДНК в исследуемом образце, справа внизу — оптическая плотность (ОП) образца при разных длинах волн (от 230 нм до 320 нм) В образцах ДНК, не содержащих примеси, ОП при длине волны 320 нм должна быть равно 0.



# 14. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

## Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений

---

---

**Цель:** познакомиться с методами качественного и количественного определения основных пигментов (хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов) фотосинтетического аппарата растительной клетки.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с основными методами разделения смеси пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений.
2. Освоить методы качественного и количественного определения содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений.
3. Выполнить задания к лабораторной работе.

Качественный и количественный состав пигментов является (в физиологическом смысле) показателем приспособленности растения к условиям окружающей среды. Так количество хлорофилла и каротиноидов, приходящееся на единицу веса, различно у растений, адаптированных к разным условиям освещения: наибольшее общее содержание хлорофилла и каротиноидов наблюдается у теневыносливых растений. Соотношение хлорофиллов *a* и *b* (Chl *a*/Chl *b*) также является показателем хроматической адаптации и меняется в ряду растений:

теневыносливые → светолюбивые → альпийские: 2,5 → 3,5—3,9 → до 5,5.

Содержание хлорофилла в исследуемом образце необходимо знать, чтобы рассчитать удельную интенсивность какой-либо фотосинтетической реакции.

**Задание 1.** *Перечислите и дайте краткую характеристику основным методам разделения смеси пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений.*

---

---

---

---

---

---

---

---

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Задание 2.** *Получите спиртовую вытяжку смеси пигментов зеленого листа, опишите оптические свойства хлорофилла.*

**Материалы и оборудование:** свежие листья какого-либо зеленого растения, 96 % спирт, мел, вода, вазелин, ступка фарфоровая с пестиком, пробирки, воронка, фильтровальная бумага, стеклянная палочка, пинцет, штатив, ножницы, шпатель, скальпель.

**Ход работы:**

1. Навеску растительного материала 100 мг измельчить ножницами и поместить в фарфоровую ступку.
2. Добавить к растительному материалу мел на кончике скальпеля и растереть в фарфоровой ступке с 2—3 мл этилового спирта до образования однородной кашицы.
3. К растертой массе прилить чистый этиловый спирт, доводя объем до 20 мл, тщательно перемешать, накрыть фильтровальной бумагой и дать настояться в течение 5 минут.
4. Приготовить складчатый фильтр, смочить водой и поместить в воронку.
5. Носик ступки с внешней стороны смазать вазелином.
6. Полученную спиртовую вытяжку пигментов отфильтровать. Для этого стеклянную палочку поставить в воронку под углом  $60^\circ$  и осторожно слить настоявшийся раствор спиртовой вытяжки смеси пигментов на фильтр. Довести объем вытяжки до 25 мл. Полученная вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.
7. Стаканчик со спиртовой вытяжкой рассмотреть в проходящем свете так, чтобы в глаз попали лучи, прошедшие через стаканчик с вытяжкой. Отметить окраску. Рассмотреть спиртовую вытяжку в проходящих лучах через синий светофильтр. Отметить окраску.
8. Пробирку со спиртовой вытяжкой хлорофилла поместить над источником света. Позади пробирки поместить темный фон и рассмотреть спиртовую





8. В эту пробирку добавить 1—2 кристаллика  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , нагреть раствор на водяной бане до изменения окраски.
9. Сделать заключение по работе. Написать химические формулы феофитина и медьпроизводного хлорофилла.

**Задание 5.** *Определите количество основных фотосинтетических пигментов с помощью спектрофотометра.*

**Материалы и оборудование:** спектрофотометр, спиртовая вытяжка пигментов, спирт.

**Ход работы:**

1. Для расчёта концентрации хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в вытяжке пигментов определить оптическую плотность вытяжки на спектрофотометре при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения определяемых пигментов в данном растворителе:  $\lambda = 663, 646$  и  $470$  нм. Контроль — чистый растворитель (96 % спирт).
2. Концентрацию пигментов в вытяжке рассчитать по следующим формулам:

$$\begin{aligned}C_{\text{Chl } a} [\text{мг/л}] &= 12,21D_{663} - 2,81D_{646}, \\C_{\text{Chl } b} [\text{мг/л}] &= 20,13D_{646} - 5,03D_{663}, \\C_{\text{car}} [\text{мг/л}] &= (1000D_{470} - 3,27C_{\text{Chl } a} - 100C_{\text{Chl } b}) / 229,\end{aligned}$$

где  $D_{470}$ ,  $D_{646}$  и  $D_{663}$  — оптическая плотность вытяжки при 470, 646 и 663 нм соответственно;  $C$  — концентрация пигмента в вытяжке, [мг/л].

3. Установив концентрацию пигмента в вытяжке, определить его содержание в исследуемой ткани с учётом объёма вытяжки и массы пробы:

$$F [\text{мг/г сыр. массы}] = V \times C / P,$$

где  $F$  — содержание пигмента в растительном материале, [мг/г сырой массы];  $V$  — объём вытяжки, [л];  $C$  — концентрация пигмента, [мг/л];  $P$  — навеска растительного материала, [г].

4. Рассчитать соотношение пигментов  $\text{Chl } a / \text{Chl } b$  и  $(\text{Chl } a + b) / \text{car}$ . Количество пигментов выражают в миллиграммах на единицу сырой или сухой массы, на единицу площади листа и в процентах от сухой (сырой) массы.



# 15. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

## Определение токсичности проб воды и снега на основе измерений интенсивности свечения реагента «Энзимолюм»

---

**Цель:** познакомиться с биолюминесцентным методом определения токсичности проб воды и снега путем измерения интенсивности свечения реагента «Энзимолюм».

**Задачи:**

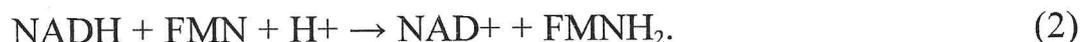
1. Ознакомиться с принципом работы реагента «Энзимолюм».
2. Изучить процесс биолюминесценции и ее примеры в живом мире.
3. Освоить метод определения токсичности различных проб на основе измерений интенсивности свечения реагента «Энзимолюм».
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

Реагент «Энзимолюм» изготовлен на основе биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизованной в крахмальный гель совместно с субстратами (миристиновым альдегидом и NADH). Фермент люцифераза катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного флавинмононуклеотида, продуктом реакции является излучение света в сине-зеленой области спектра (реакция 1). Для обеспечения люциферазы восстановленным флавинмононуклеотидом применяется сопряжение люциферазной реакции с реакцией, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой (реакция 2).

люцифераза



NADH:FMN-оксидоредуктаза

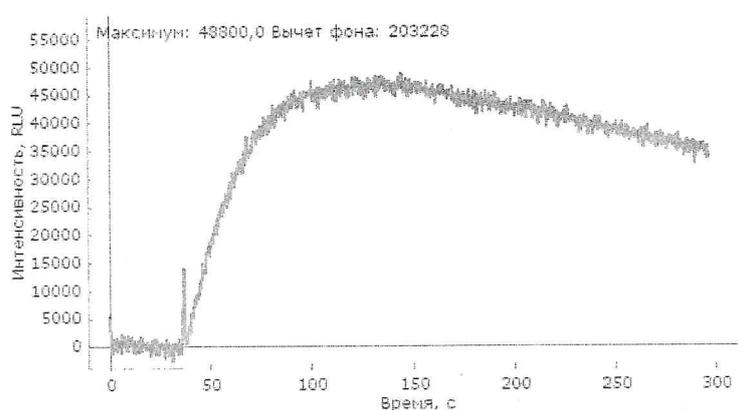


На основе биферментной системы разработаны методы оценки интегральной токсичности различных сред.

Определение токсичности проб основано на регистрации различий максимальной интенсивности свечения реагента «Энзимолюм» в дистиллированной воде (контроль) и тестируемых пробах (опыт). Токсическое действие исследуемых проб на реагент «Энзимолюм» определяется по изменению интенсивности



1. В мерный стаканчик на 50 мл налить дистиллированной воды — контрольная проба.
2. Во второй набрать снег, дать растаять, чтобы получилось примерно 20 мл воды — опытная проба.
3. Провести разведение опытной пробы дистиллированной водой в 2, 10 и 50 раз.
4. На компьютере включить программу «Lumishot», нажать вкладку «новое измерение».
5. Выставить период измерения 1 секунда.
6. В 2 чистых кюветы пинцетом внести один диск реагента «Энзимоллюм», добавить 300 мкл дистиллированной воды.
7. Начать измерение, нажав на старт, через 5—10 с нажать «вычисть фон».
8. Добавить в 1-ю кювету 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Кювету поместить в биолюминометр, закрыть крышку и зарегистрировать максимальную интенсивность свечения реагента в контрольной пробе  $I_k$  (в течение 2 минут). Изображение должно выглядеть следующим образом:



9. Повторить измерение дистиллированной воды во второй кювете. Рассчитать  $I_{\text{ср.к}}$  — среднее значение максимальной интенсивности свечения в контрольной пробе.
10. В 2 чистых кюветы пинцетом внести по два диска реагента «Энзимоллюм», добавить 300 мкл растаявшего снега в самом высоком разведении (50 раз).
11. Начать измерение, нажав на старт, через 5—10 сек. нажать вычисть фон.
12. Добавить в кювету 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Кювету поместить в биолюминометр, закрыть крышку прибора и зарегистрировать максимальную интенсивность свечения реагента в опытной пробе  $I_o$ . (в течение 2 минут).
13. Повторить измерение во второй кювете. Рассчитать  $I_{\text{ср.о}}$  — среднее значение максимальной интенсивности свечения в опытной пробе.
14. Для опытной пробы рассчитать люциферазный индекс токсичности (ЛИТ, %) по формуле

$$\text{ЛИТ} = \frac{(I_{\text{ср.к}} - I_{\text{ср.о}})}{I_k} 100 \%$$



## 16. ЗАДАЧИ К ИТОГОВОМУ КОЛЛОКВИУМУ

---

### Задача 1.

Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса. Какая стадия в представленном списке повторяется?

1. Подготовка и стерилизация субстрата.
2. Культивирование биообъекта.
3. Ультразвуковая дезинтеграция клеток.
4. Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций.
5. Очистка целевого продукта.
6. Анализ целевого продукта.
7. Подготовка посевного материала.
8. Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции.
9. Разделение культуральной суспензии.
10. Биологическая очистка отходов.
11. Выделение целевого продукта.

### Задача 2. Объектами биотехнологии являются:

- 1) клетки высших растений;
- 2) клетки животных и человека;
- 3) эубактерии;
- 4) галобактерии;
- 5) метаногены;
- 6) грибы (актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи).

Какие еще организмы могут являться объектами биотехнологии? Где они могут использоваться?

### Задача 3.

В биотехнологии существует два метода культивирования микроорганизмов: периодический и непрерывный. Напишите преимущества каждого из методов. Предположите, какое биотехнологическое производство можно проводить сочетанием этих методов.

#### Задача 4.

Найдите соответствие:

##### Группы методов дезинтеграции

1. Физические
2. Химические

##### Методы

- А. Ультразвук
- Б. Применение ферментов, разрушающих клеточную стенку
- В. Декомпрессия
- Г. Разрушение толуолом
- Д. Экструдирование клеток под высоким давлением
- Е. Разрушение детергентами

#### Задача 5.

Дайте краткую характеристику поверхностному и глубинному методам культивирования микроорганизмов. Какой из методов технически более совершен — поверхностный или глубинный, почему? Для чего при глубинном методе осуществляют концентрирование фильтрата перед его выделением?

#### Задача 6.

Для решения проблем рентабельности производства, его экологичности, управляемости производственным процессом, повышения качества получаемых продуктов используют иммобилизацию микроорганизмов и растительных клеток или их ферментов. Опишите суть метода. Укажите преимущества этого метода.

#### Задача 7.

Какие микроорганизмы используются в качестве продуцентов при получении генноинженерного инсулина? Почему ферментационные среды должны содержать лактозу и галактозу?

#### Задача 8.

В качестве продуцента рекомбинантного человеческого инсулина используют также пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Какими преимуществами они обладают перед другими изученными и культивируемыми в промышленном масштабе микроорганизмами?

#### Задача 9.

Природный штамм микроорганизмов в отличие от промышленного продуцента малоэффективен. С помощью каких методов можно получить промышленный штамм микроорганизмов, их краткая характеристика?

### **Задача 10.**

Известно, что многие ценные лекарственные растения нельзя культивировать в России из-за климатических условий. Предложите возможности решения этой проблемы с помощью биотехнологии.

### **Задача 11.**

Что такое явление тотипотентности? Значение этого явления для получения биотехнологических продуктов растительного происхождения?

### **Задача 12.**

Известно, что некоторые заболевания (как наследственные, так и ненаследственные) могут быть связаны не с дефицитом конкретного белка или его дефектом, а наоборот, с гиперпродукцией продуктов нормального функционально активного белка. Отсюда следует задача частичного или полного подавления продукции такого белка. Иначе говоря, необходимо избирательно подавлять экспрессию гена, кодирующего этот белок, или гена фермента, участвующего в посттрансляционной модификации данного белка и превращении его в активную форму.

В соответствии с этим была выдвинута концепция создания инновационных лекарственных средств, получивших общее название антисмысловые олигонуклеотиды. Что такое антисмысловые олигонуклеотиды? Как получают? Какие трудности возникают при использовании?

### **Задача 13.**

На фармацевтическом рынке присутствуют диагностические тесты на основе моноклональных антител. Что это такое? Как получают?

### **Задача 14.**

Предложите инновационный способ очистки сточных вод с помощью биотехнологического производства.

### **Задача 15.**

Проблема безопасности биотехнологического производства требует соблюдения определенных условий. Какие условия на физической и генетическом уровне гарантируют безопасность работы со штаммом-продуцентом?

# СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

---

---

## Основная литература

1. Процессы и аппараты биотехнологии: ферментационные аппараты : учеб. пособие / А. Ю. Винаров [и др.]. — 2-е изд., пер. и доп. — Москва : Юрайт, 2018. — 275 с.
2. Биотехнология : в 2 ч. Ч. 1 : учеб. и практикум / Е. А. Живухина [и др.]. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Юрайт, 2018. — 162 с.
3. Биотехнология : в 2 ч. Ч. 1 : учеб. и практикум / Н. В. Загоскина [и др.]. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Юрайт, 2018. — 219 с.

## Дополнительная литература

4. Биотехнология растений : учебник и практикум / Л. В. Назаренко [и др.]. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Юрайт, 2018. — 161 с.
5. Нетрусов, А. И. Микробиология : учеб. для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — Москва : Академия, 2012. — 379 с.
6. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения : учеб. для вузов / О. А. Неверова и [и др.]. — Москва : Инфра-М, 2014. — 317 с.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Правила оформления реферативных сообщений

Оформление реферата осуществляется в соответствии с инструктивными материалами и ГОСТами (аналогично оформляются курсовые и дипломные работы, научные отчеты и пр.).

Нормативные ссылки для оформления реферата:

ГОСТ 1.5-93 Государственная система стандартизации РФ. Общие требования к построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов.

ГОСТ 6.38-90 Унифицированные системы документации. Система организационно-распорядительной документации. Требования к оформлению документов.

ГОСТ 7.1-84 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ Р 7.0.5-2008 Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления.

#### Общие требования и нормы

Поля документа: левое — 3 см, верхнее/нижнее — 2 см, правое — 1,5 см.

Шрифт — Times New Roman, Кегль — 14, межстрочный интервал — 1,5 см, выравнивание текста — по ширине, красная строка — 1,25 см.

#### Структура реферата:

- титульный лист;
- содержание;
- обозначения и сокращения;
- введение;
- основная часть;
- заключение;
- список использованных источников.

На титульном листе указывают наименование высшего учебного заведения; факультет, кафедру, где выполнялась работа; название работы; фамилию и ини-

циалы студента; ученую степень и ученое звание, фамилию и инициалы преподавателя; город и год выполнения работы.

Нумерация страниц реферата начинается с титульного листа, но номер на титульном листе не ставится. Номер ставится по центру внизу страницы.

В содержании должны быть отражены **все** заголовки и подзаголовки частей реферата с указанием страниц.

После содержания должен идти лист с расшифровкой всех сокращений, используемых в реферате.

Введение должно содержать оценку современного состояния решаемой научно-технической проблемы, основание и исходные данные для разработки темы реферата.

В основной части излагаются теоретические основы по выбранной тематике. Изложение должно вестись в форме теоретического анализа проработанных источников применительно к выполняемой теме логично, последовательно и грамотно. При необходимости данный раздел может состоять из отдельных подразделов. Из содержания теоретического обзора должно быть видно состояние изученности темы в целом и отдельных ее вопросов. **После каждого абзаца с чужой (позаимствованной) мыслью должна стоять ссылка на литературный источник.**

Заключение должно содержать краткие выводы по результатам анализа литературы в ходе раскрытия заданной темы.

## Пример оформления титульного листа

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Челябинский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)  
Биологический факультет  
Кафедра микробиологии, иммунологии и общей биологии

Направление (специальность): 06.03.01 «Биология»  
\_\_\_\_\_  
(наименование направления (специальности))

Дисциплина: Введение в биотехнологию  
\_\_\_\_\_  
(наименование дисциплины)

### РЕФЕРАТ ТЕМА:

**ВЫПОЛНИЛ СТУДЕНТ**  
**Фамилия, имя, отчество**  
**Академическая группа**      **Курс**  
**Формы обучения**

(подпись)  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_г.

**ПРОВЕРИЛ**  
**Фамилия, имя, отчество**  
Филиппова Юлия Юрьевна  
**Ученая степень**  
кандидат биологических наук  
**Ученое звание**  
**Должность** доцент кафедры  
микробиологии, иммунологии  
и общей биологии

(оценка) (подпись)  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_г.

Челябинск  
201\_  
\_\_\_\_\_  
69

**План доклада и критерии оценки  
к практической работе по теме  
«Биотехнология промышленных производств»**

**План доклада:**

1. Селекция штаммов-продуцентов (биотехнологические объекты);
2. Используемые субстраты и аппаратура (из чего и на чем готовят);
3. Основные этапы технологического процесса (как готовят);
4. Выделение продукта, получение коммерческого препарата.

**Критерии оценки:**

Выступление оценивается преподавателем и студентами по 10-балльной шкале:

- максимум 3 балла, если понятно описаны биотехнологические объекты;
- 3 балла, если представлены все возможные субстраты и аппаратура;
- 3 балла, если четко приведены этапы биотехнологического процесса;
- 1 балл за креативность.

## Методика окрашивания мазков по Граму

1. Обезжирить чистое предметное стекло.
2. Нанести бактериологической петлей каплю стерильного физраствора на центр предметного стекла.
3. Набрать петлей бактериальную массу и смешать с физраствором на предметном стекле.
4. Высушить мазок на воздухе.
5. Зафиксировать мазок: предметное стекло с препаратом взять пинцетом за рёбра мазком кверху и плавными движениями провести 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 секунд.
6. Нанести на фиксированный мазок генцианвиолет, выдержать 3 минуты.
7. Слить краску, залить мазок раствором Люголя, выдержать 1 минуту.
8. Слить раствор Люголя, нанести 96° раствор этилового спирта, выдержать 30 секунд.
9. Промыть тщательно в проточной воде в течение 1 минуты.
10. Добавить фуксин, выдержать 2 минуты.
11. Промыть препарат водопроводной водой, подсушить фильтровальной бумагой.

**План доклада и критерии оценки  
к практической работе по теме  
«Биотехнологии в охране окружающей среды»**

План доклада:

1. Современное состояние проблемы
2. Имеющиеся на сегодняшний день способы решения проблемы
3. Ваш альтернативный способ решения проблемы: цель проекта, сроки реализации, этапы выполнения, примерная стоимость (смета), экономическая эффективность.

**Критерии оценки:**

Выступление оценивается преподавателем и студентами по 10-балльной шкале:

- максимум 3 балла, если понятно имеющиеся на сегодняшний день способы решения проблемы;
- 3 балла, если понятен и интересен предложенный авторами способ решения проблемы;
- 3 балла, если четко рассчитана смета и показана экономическая эффективность проекта;
- 1 балл за креативность.

**РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ**  
для лабораторных занятий по дисциплине  
«Введение в биотехнологию»

*2-е изд., перераб. и доп.*

Составитель Филиппова Юлия Юрьевна

Корректурa *Е. С. Меньшениной*  
Компьютерная верстка *Е. С. Меньшениной*

Подписано в печать 06.12.19.  
Усл. печ. л. 4,2. Уч.-изд. л. 3,5.  
Тираж 80 экз. Заказ 456.

Челябинский государственный университет  
454001, Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129

Издательство Челябинского государственного университета  
454021, Челябинск, ул. Молодогвардейцев, 576