

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Челябинский государственный университет»

РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ
для лабораторных занятий по дисциплине
«ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ»

Студента (студентки)
биологического факультета,
группы _____
Ф.И.О. _____

Челябинск
Издательство Челябинского государственного университета
2017

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Челябинский государственный университет»

РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ
для лабораторных занятий по дисциплине
«ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ»

Студента (студентки)
биологического факультета,
группы _____
Ф.И.О. _____

Челябинск
Издательство Челябинского государственного университета
2017

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

Рабочая тетрадь содержит практические задания по основным разделам программы курса «Введение в биотехнологию». Рассматриваются разделы: «Пищевая биотехнология», «Фармацевтическая биотехнология», «Инженерная энзимология», «Промышленная биотехнология» и «Биотехнологии в охране окружающей среды». Для каждой темы приведены отчетные задания, целью которых является качественное усвоение студентами знаний, получаемых в ходе теоретического лекционного курса, а также приобретение практических навыков.

Предназначено для студентов,
обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология» (бакалавриат)

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 Н. Э. Хайдаршина

1. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Основные направления современной биотехнологии.

Знакомство с работой в лаборатории биотехнологии

Цель: получить представления о науке биотехнологии.

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 инструктаж по технике безопасности. Его результаты 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, одежду, 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. Они должны быть закрытыми спереди, достаточно длинными и застегиваться полностью. Рукава должны плотно охватывать запястья.

- Перед началом работы собрать распущенные волосы в хвост или под медицинскую шапочку. Если на руках есть повреждения кожи, заклеить их лейкопластырем или воспользоваться напальчником.

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 наконечники и пипетки Пастера 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 следует собирать в закрывающиеся емкости и передавать в автоклавную или дезинфицировать 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 без присмотра включенные электронагревательные приборы, кроме тех, что по своему назначению и конструкции рассчитаны на круглосуточную работу;

— в пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более $1/3$ объема пробирки;

— во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять их отверстия на себя и других людей; нельзя заглядывать сверху в открытые 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.

Дайте ответы 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) 1/2 объема;
- б) 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.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Биотехнология промышленных производств

Цель: получить представления об особенностях некоторых биотехнологических промышленных производств.

Задачи:

1. Прослушать доклады на следующие темы:

- 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.
2. Выполнить задания к практической работе.

Задание 1. *Дайте ответы на следующие вопросы по темам докладов:*

1. Как происходит селекция штаммов-продуцентов в промышленном пивоварении/виноделии? Какие биологические объекты используются?

2. Какие субстраты используются при промышленном получении инсулина/антибиотиков?

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 мясопептонного 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 легкоусвояемом 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, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена.

3. Должны быть изотоничными для микробной клетки, то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5%-му раствору натрия хлорида.

4. Должны быть стерильными, так как посторонние микроорганизмы препятствуют росту изучаемого микроорганизма, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, pH и др.).

5. Должны быть по возможности унифицированным, то есть содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

6. Желательно, чтобы среды были прозрачными — удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Задание 1. *Напишите классификацию питательных сред, приведите примеры питательных сред:*

а) по физическому состоянию

б) по составу

Задание 3. *Приготовьте питательную среду МПБ.*

Материалы и оборудование: электроплитка, мясо, пептон, NaCl, марля, бумажный фильтр, термостойкие колбы и стаканы, химические пробирки, флакон на 200 мл.

Ход работы:

1. Прокипятить мясо в течение 15 мин на электроплитке.
2. Во время кипячения приготовить навески: 50 мг пептона и 10 мг NaCl.
3. Полученный отвар остудить и процедить в термостойкий стакан через 2-3 слоя марли.
4. В процеженный отвар при подогревании и помешивании добавить 50 мг пептона и 10 мг NaCl, дождаться полного растворения пептона.
5. Профильтровать отвар в горячем состоянии через двойной бумажный фильтр.
6. Проверить pH среды с использованием pH-метра 150М.
7. Налить 2 мл полученного мясопептонного бульона 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 Сёренсена).*

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

Концентрация аминного азота — важная характеристика питательных сред, так как показывает количество азота, которое доступно для усвоения бактериями. **Аминный азот (NH₂)** — это суммарный азот аминогрупп 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 аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп.

Ход работы:

1. В первую пробирку налить 2 мл исследуемой среды (МПБ), во вторую — 2 мл 40%-го формальдегида.
2. В каждую пробирку добавить 2-3 капли фенолфталеина.
3. Для нейтрализации растворов до pH 7,0 (формальдегид) и 9,0 (МПБ) титровать каждый раствор 1,5N NaOH до появления слабо-розового окрашивания (записать количество потраченного NaOH).
4. Соединить исследуемую среду с раствором 40%-го 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.

7. Рассчитать количество аминного азота по формуле

$$X = (a \cdot 100 \cdot 2,8) / 2,$$

4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Виды брожений. Спиртовое брожение.

Уксуснокислое брожение

Цель: познакомиться с качественными реакциями для определения спиртового и уксуснокислого брожения, с морфологией возбудителей этих видов брожения.

Задачи:

1. Изучить методы стерилизации посуды и питательных сред.
2. Ознакомиться с представителями спиртового и уксуснокислого брожения.
3. Разобрать морфологию и культуральные свойства дрожжей *S. cerevisiae* и уксуснокислых бактерий *A. aceti*.
4. Провести качественные реакции на спиртовое и уксуснокислое брожение.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

Методы стерилизации посуды и питательных сред

Стерилизация — важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов. Стерилизуют посуду, инструменты и сами питательные среды, используемые в работе. Существует термическая и холодовая стерилизация.

Задание 1. Опишите принципы стерилизации:

а) термической (кипячение, стерилизация сухим жаром, стерилизация паром, пастеризация)

б) холодной (фильтрация, УФ-излучение)

Брожение — эволюционно наиболее древняя форма биологического окисления, которое обеспечивает получение энергии в анаэробных условиях. Брожение характерно для ряда групп прокариот. Основные типы брожения: спиртовое, молочнокислое и маслянокислое — были открыты Луи Пастером в 1860-х годах, хотя продукты брожения были известны человеку с незапамятных времен.

Представители спиртового брожения

Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе. К ним относят дикие дрожжи рода *Mycoderma* и *Torula*, плесневые грибы рода *Mucor* и некоторые бактерии. Культурные дрожжи выведены путем длительной селекции из диких дрожжей. К ним относятся: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. vini*

и *S. ellipsoids*. Эти дрожжи отличаются от диких тем, что способны выдерживать большие концентрации спирта (до 15 %) в среде, образуют меньше побочных продуктов брожения (высшие спирты или сивушные масла), вследствие чего интенсивнее идут процессы брожения. Наибольшее практическое значение имеет вид дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Штаммы *S. cerevisiae* подразделяют на расы верхового и низового брожения. Они используются в хлебопечении, получении спирта, пивоварении, виноделии, производстве кваса и некоторых кисломолочных продуктов.

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%-й раствор едкого натра, йод кристаллический, петли микробиологические, набор для окрашивания по Граму (раствор люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги), предметные стекла, спиртовки, стакан на 100 мл, штатив, 2 цилиндрические пробирки, мерная пробирка.

Ход работы:

1. В две пробирки (одна с завинчивающейся крышкой и одна химическая) налить по 5 мл раствора бродящей жидкости.

2. Первую пробирку (с завинчивающейся крышкой) использовать для обнаружения возбудителя спиртового брожения:

а) центрифугировать пробирку 5 мин при 1,5 тыс. об./мин;

б) надосадок слить в слив, из осадка приготовить мазок, окрасить по Граму (приложение 3);

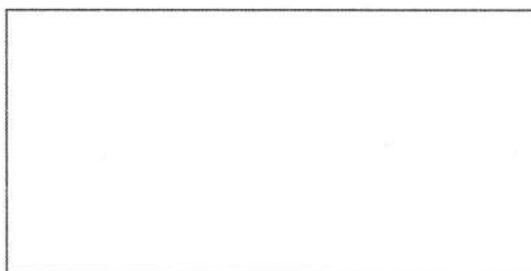
в) микроскопировать мазок при увеличении 90× (масляная иммерсия).

3. Вторую пробирку использовать для проведения качественной реакции с кристаллическим йодом:

а) к 5 мл бродящей жидкости добавить 1 мл концентрированного раствора 10%-й 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. Записать уравнения реакций образования йодоформа. Какие тесты необходимо провести, чтобы определить вид микроорганизма?

Представители уксуснокислого брожения

Уксуснокислые бактерии объединены в род *Acetobacter*. Эти бактерии встречаются повсеместно в природе, в пыли, на фруктах и овощах. Для получения энергии они окисляют этиловый спирт до этиловой кислоты и воды в строго аэробных условиях. При этом выделяется значительное количество энергии (около 500 кДж).

Задание 4. *Опишите морфологию типового вида уксуснокислых бактерий — Acetobacter aceti. Напишите уравнения цикла реакций образования уксуса из глюкозы, протекающих в клетках микроорганизмов (брожение).*

Задание 5. Проведите качественную реакцию на уксусную кислоту, зарисуйте морфологию возбудителя уксуснокислого брожения.

Материалы и оборудование: кислое пиво, 10%-й раствор соды, 5%-й раствор хлорного железа (FeCl_3), набор для окрашивания по Граму (раствор люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги), предметные стекла, спиртовка, штатив, цилиндрическая пробирка, мерная пробирка.

Ход работы:

1. Из пленки на поверхности пива сделать мазок, окрасить по Граму (приложение 3).

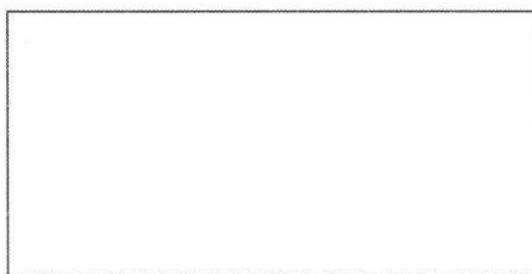
2. Микроскопировать мазок при увеличении $90 \times$ (масляная иммерсия).

3. Сделать качественную реакцию на уксусную кислоту:

а) к 5 мл скисшего пива в химическую пробирку добавить 2 мл 10%-го раствора соды;

б) к полученной смеси добавить 1 мл 5%-го раствора хлорного железа; при необходимости нагреть; при наличии уксусной кислоты появляется бурокоричневое окрашивание вследствие образования ацетата железа и характерный уксусный запах.

4. Зарисовать морфологию возбудителя уксуснокислого брожения, подписать род/вид выделенного микроорганизма:



5. Написать уравнения протекания качественной реакции на уксусную кислоту.

5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Виды брожений. Молочнокислое брожение.

Определение кислотности молока

Цель: знакомство с биохимическими основами процесса молочнокислого брожения, 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 кисломолочных продуктах.
4. Освоить метод определения кислотности молока по Тернеру.
5. Выполнить задания к лабораторной работе.

Биохимические основы молочнокислого брожения

Молочнокислое брожение вызывают микроорганизмы, 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 пр.

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

а) в первую пробирку пипеткой Пастера к 9 мл физраствора прилить 1 мл исследуемого продукта, пипетку замочить в дезрастворе; взять новую пипетку, тщательно перемешать суспензию;

б) этой же пипеткой отобрать 1 мл во вторую пробирку, пипетку замочить в дезрастворе; взять новую пипетку, тщательно перемешать суспензию, повторить операцию еще два 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 дезраствор.

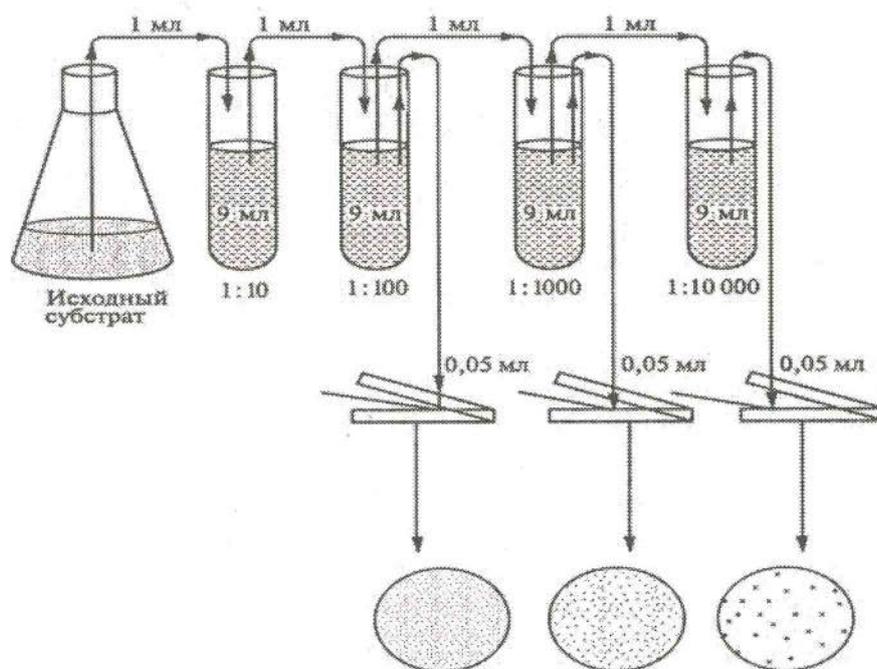


Схема титрования микроорганизмов

6. Инкубировать микроорганизмы при температуре 37 °С в течение 48—72 ч.

7. Определить количество исследуемых бактерий в кисломолочном продукте. Сделать заключение о соответствии полученного вами количества 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 молоко и кисломолочный продукт, 0,1N раствор NaOH, раствор фенолфталеина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, мерные пробирки.

Ход работы:

1. В 2 колбы на 250 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.

Градус Тернера (°Т) — условная величина, равная количеству миллилитров 0,1N раствора щелочи, израсходованного на титрование 100 мл молока.

Пример расчета: на титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1N раствора щелочи; рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока:

5 мл щелочи — 10 мл молока;

x мл щелочи — 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит: $5 \times 100 / 10 = 50$ °Т

Кислотность парного молока колеблется от 10 до 25 °Т.

Предельная кислотность молока колеблется от 110 до 115 °Т.

4. Сделать заключение о соответствии кислотности контрольной пробы (свежего молока) общепринятым нормам. По табличным значениям кислотности молочных продуктов определить, какой кисломолочный продукт был исследован.

6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Иммобилизация биокатализаторов включением в гели.

Включение клеток дрожжей в гели агара

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 агара-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 студнеобразное состояние. В результате клетки оказываются окруженными пространственной сеткой набухшего, сшитого химическими или физическими связями полимера. Через эту сетку происходит поступление к клеткам 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 электроноакцепторных групп для этих соединений основным типом межмолекулярных нековалентных

Задание 3. *Рассчитайте количество NaCl, необходимое для получения 50 мл 3-молярного раствора.*

Задание 4. *Проведите иммобилизацию клеток дрожжей в гели агара.*

Материалы и оборудование: дрожжи, 0,9%-й раствор NaCl, термостат, стакан на 50 мл, торсионные весы, сухой агар, водяная баня, шприц, 3М раствор хлористого натрия, бумажный фильтр, колба на 50 мл, 10%-й раствор глюкозы.

Ход работы:

1. Приготовить 50 мл 0,9%-го раствора NaCl.
2. Суспендировать 1 г сухих дрожжей в 4 мл 0,9%-го раствора NaCl и поставить в термостат на 20 мин при 37 °С для активации дрожжей.
3. В термостойкую колбу внести 300 мг сухого агара, добавить 10 мл 0,9%-го NaCl и оставить на 10—15 мин при комнатной температуре для набухания.
4. Во время инкубации приготовить 50 мл 3М раствора NaCl. Поставить раствор охлаждаться в холодильник; приготовить 10 мл 10%-го раствора глюкозы.
5. После набухания поместить стакан с агаром на кипящую водяную баню, нагревать до полного растворения агара. Смесь непрерывно перемешивать.
6. Когда агар расплавится, охладить жидкость до 45—50 °С (температура гелеобразования) и быстро влить в него, непрерывно перемешивая, суспензию клеток дрожжей.

Задание 2. Выделите культуру сенной палочки, обладающей амилолитической активностью.

Материалы и оборудование: термостат, водяная баня, сено, среда МПА с крахмалом, стакан, цилиндрическая пробирка, дозатор на 1 мл, наконечники, люголь, стекла, набор для окрашивания мазков по Граму.

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 мин.

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*

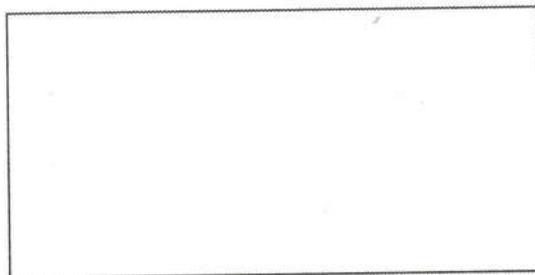
3. 100 мкл остывшего фильтрата налить в центр чашки Петри, содержащей плотную питательную среду МПА с 1%-м крахмалом.

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 Граму (**приложение 3**), зарисовать морфологию микроорганизмов — продуцентов амилаз:



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

8. Сделать заключение по работе.

8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение амилалитической 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 амилалитических ферментов и их применение в биотехнологии.
2. Освоить колориметрический метод определения амилалитической 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. fermentum — «закваска») называли «организованные ферменты» (то есть сами живые микроорганизмы), а термин «энзим» (от греч. en — «в» и zyme — «закваска») был предложен в 1876 году В. Кюне для «неорганизованных ферментов», секретируемых клетками желудка или кишечника. Через два года после смерти Л. Пастера (1897) 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 году за эту работу он был удостоен Нобелевской премии.

Классификация ферментов

Классификация ферментов основана на механизме их действия и включает шесть 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).

Классы ферментов

Класс	Тип катализируемой реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции
Трансферазы	Перенос отдельных групп атомов от донорной молекулы к акцепторной молекуле
Гидролазы	Гидролитическое (с участием воды) расщепление связей
Лиазы	Расщепление связей способом, отличным от гидролиза или окисления
Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров
Лигаза (синтетаза)	Образование связей в реакции конденсации двух различных соединений (используется энергия АТФ)

Задание 1. *Напишите классификацию, тип катализируемой реакции, свойства амилолитических ферментов и их применение в биотехнологии.*

Задание 2. *Определите амилолитическую активность ферментов *Bacillus subtilis* колориметрическим методом (по ГОСТ 20264.4-74).*

Материалы и оборудование: пробирка с микроорганизмами, химическая пробирка, цилиндрические пробирки, мерная пробирка, пипетки Пастера, 1%-й раствор крахмала, рабочий раствор йода, дистиллированная вода, штатив, маркер, водяная баня, центрифуга, ФЭК.

Ход работы:

1. Перелить жидкую питательную среду МПБ с выросшими на ней микроорганизмами из стеклянной пробирки в пластиковую.
2. Центрифугировать пробирку с микроорганизмами 5 мин при 1,5 тыс. об./мин.
3. В две цилиндрические пробирки налить по 5 мл 1%-го раствора крахмала и поставить их в водяную баню с температурой 30 °С на 10 мин.
4. Через 10 мин, не вынимая пробирок из водяной бани, налить в первую пробирку 2 мл дистиллированной воды (контрольная проба), во вторую — 2 мл отцентрифугированной культуральной жидкости (опытная проба).
5. Смеси быстро перемешать и выдержать в водяной бане 10 мин.
6. Из контрольного и опытного растворов отобрать по 1 мл раствора и перенести их в пробирки с 5 мл рабочего раствора йода. Содержимое проби-

рок 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

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

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

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

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 ч действия фермента); c — количество прогидролизованного крахмала, г; 1000 — коэффициент пере-

9. ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Биотехнологии в охране окружающей среды

Цель: получить представления об особенностях использования биотехнологических процессов в охране окружающей среды.

Задачи:

1. Прослушать доклады на следующие темы:

- Рекультивация земель и водных ресурсов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

- Биотехнология очистки сточных вод.

- Утилизация твердых отходов с помощью биотехнологических производств.

- Биотехнологическая очистка атмосферного воздуха.

- Сохранение и восстановление биоразнообразия при добыче полезных ископаемых.

2. Выполнить задание к практической работе.

Правила оформления реферативного сообщения, план доклада и критерии оценки представлены в приложениях 1, 4.

Задание 1. *Дайте ответы на следующие вопросы по темам докладов:*

1. Перечислите и кратко охарактеризуйте физические методы очистки почвы от нефти.

2. В чем принципиальное отличие аэротэнков от метатэнков?

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

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 *E. coli* 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 BLBIO-M.
3. Освоить метод ферментации *E. coli* в лабораторном ферментере.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

Периодический метод культивирования микроорганизмов

Процесс периодического культивирования *Escherichia coli* ATCC 25922 осуществляют в лабораторном ферментере (рабочий объем 1 л), оснащенный барботером (обеспечивающим аэрацию питательной среды) и нагревательным прибором, позволяющим 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 (см. рис.).



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**. Устанавливается равновесие между числом жизнеспособных и отмирающих клеток, скорость роста 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, ухудшаются 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

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

Задание 3. Проведите ферментацию *E. coli* в лабораторном ферментере, нарисуйте кривую роста бактерий, рассчитайте удельную скорость роста микроорганизмов.

Материалы и оборудование: ферментер, спектрофотометр, среда МПБ, среда МПБ с суточной культурой *E. coli*, 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 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 *E. coli* из двух пробирок (общий объем 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 мин 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) два-три 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 *E. coli* (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 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 плотность образца, нажав кнопку Sample. В центре появится значение оптической плотности исследуемого образца.

8. Дорисовать особенности обвязки ферментера BLBIO-M на схеме ферментера для периодического культивирования микроорганизмов.

9. Через 15, 30, 45, 60 и 240 мин после начала ферментации отобрать пробы культуральной жидкости, измерить оптическую плотность культуры микроорганизмов (повторить п. 6, 7). Данные занести в таблицу.

10. Нарисовать график зависимости оптической плотности культуры от времени ферментации.

Время, мин	Оптическая плотность культуры	Кривая роста <i>E. coli</i> ATCC 25922
0		
15		
30		
45		
60		
240		

11. Рассчитать удельную скорость роста *E. coli*. по формуле

$$\ln X_1 - \ln X_0 / T_1 - T_0,$$

где X_0 и X_1 — значения оптической плотности культуральной жидкости, соответствующие времени роста 60 и 240 мин.

12. Сделать заключение по работе. На какой фазе роста вы остановили ферментацию?

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 «цинга».

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 продукта	Кол-во аскорбиновой кислоты, 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

Задание 2. *Напишите принцип метода определения витамина С по Тильмансу. Какие вещества могут помешать точному количественному определению аскорбиновой кислоты и почему?*

Задание 3. *Определите концентрацию аскорбиновой кислоты 2,6-дихлорфенолиндофенолятом (по Тильмансу) в хвое сосны и в плодах шиповника.*

Материалы и оборудование: 0,001М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, 2%-й раствор HCl, песок кварцевый, хвоя сосны, сухой шиповник, прибор для титрования, ступка фарфоровая с пестиком, ножницы, мерные стаканчики на 50 мл, мерный цилиндр, конические колбы, пипетки Пастера, бумажный фильтр.

Ход работы:

1. Приготовить точные навески хвои и плодов шиповника массой 1 г.
2. Хвою измельчить с помощью ножниц, поместить в фарфоровую ступку.
3. Тщательно растереть хвою в фарфоровой ступке с щепоткой кварцевого песка и 5 мл 2%-го раствора соляной кислоты (в течение не менее 5 мин!).
4. Затем без потерь (обмывая ступку и пестик дистиллированной водой) перенести содержимое ступки в мерный цилиндр емкостью 50 мл и довести раствор дистиллированной водой до метки 50 мл.
5. Содержимое стаканчика тщательно перемешать, дать настояться 10 мин.

12. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур

Цель: изучить влияние различных криопротекторов на устойчивость клеток к низким температурам.

Задачи:

1. Познакомиться с понятием «криопротекторы» и областью их применения.
2. Рассмотреть виды криопротекторов, применяемых в природной среде и в лабораторных условиях.
3. Изучить свойства сахарозы и глицерина как основных криопротекторов для растительных клеток.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

При воздействии отрицательных температур в межклетниках растительных тканей образуются кристаллы льда, что приводит к повреждению клеточных мембран и обезвоживанию цитоплазмы. Увеличение количества криопротекторов в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей и тем самым приводит к повышению их морозоустойчивости.

Плазмолиз — отделение протопласта от клеточной стенки в гипертоническом растворе.

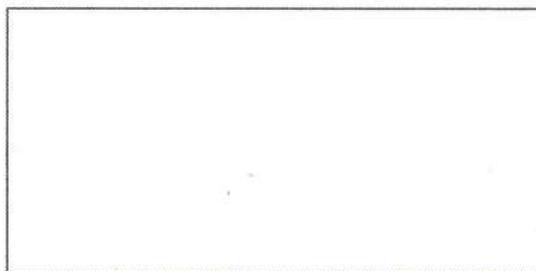
Задание 1. *Что такое криопротекторы? Какие виды криопротекторов выделяют?*

2. Пластинки ополоснуть водой до полного удаления остатков клеточного сока, поместить в пробирки:

- а) 5 мл дистиллированной воды;
- б) 2,5 мл 1М раствора сахарозы и 2,5 мл воды;
- в) 5 мл 1М раствора сахарозы;
- г) 2,5 мл 1М раствора глицерина и 2,5 мл воды;
- д) 5 мл 1М раствора глицерина;
- е) 2,5 мл 1М раствора сахарозы и 2,5 мл 1М раствора глицерина.

3. Пробирки поместить в охлаждающую смесь (лед с солью) на 25 мин.

4. Приготовить микропрепарат среза корнеплода свеклы, рассмотреть под микроскопом (увеличение $\times 10$), зарисовать клеточное строение корнеплода свеклы (наблюдаем равномерное окрашивание всех клеток):

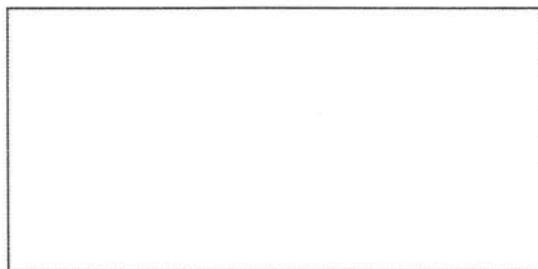


5. Вынуть пробирки из охлаждающей смеси. Перед размораживанием пронаблюдать окрашивание раствора в пробирках.

6. Разморозить растворы в стакане воды комнатной температуры.

7. Микроскопировать пластинки корнеплодов свеклы из растворов криопротекторов (увеличение $\times 10$).

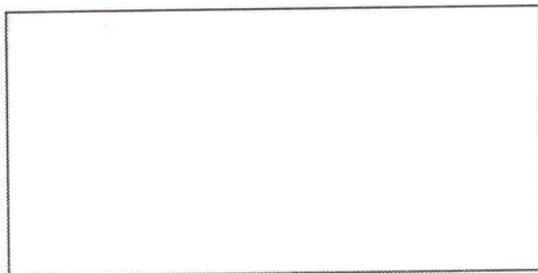
Дистиллированная вода



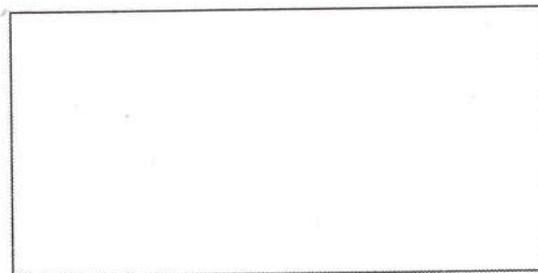
1М раствор сахарозы с водой



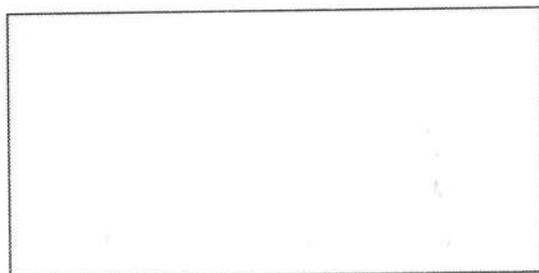
1М раствор сахарозы



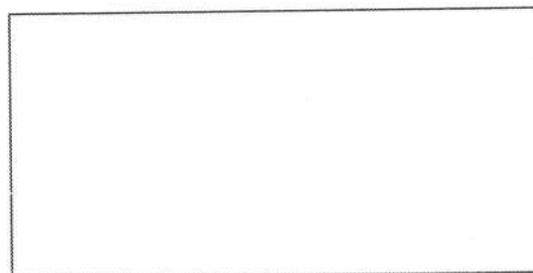
1М раствор глицерина с водой



1М раствор глицерина



1М раствор сахарозы/глицерина

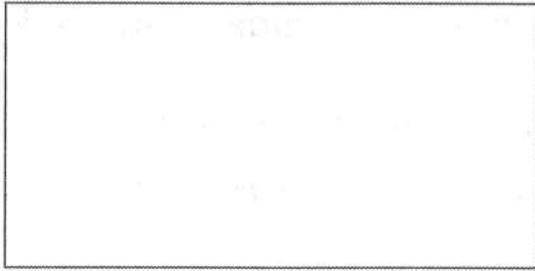


8. В каждом препарате посчитать % окрашенных клеток. Результаты занести в таблицу:

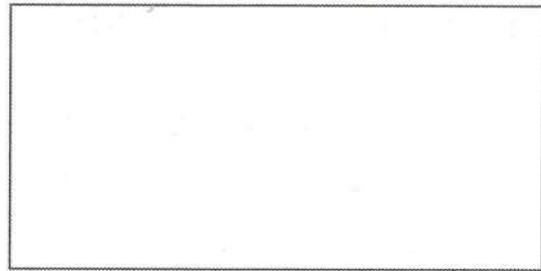
№	Раствор	Кол-во окрашенных клеток, %
1	5 мл дистиллированной воды	
2	2,5 мл 1М раствора сахарозы и 2,5 мл воды	
3	5 мл 1М раствора сахарозы	
4	2,5 мл 1М раствора глицерина и 2,5 мл воды	
5	5 мл 1М раствора глицерина	
6	2,5 мл 1М раствора сахарозы и 2,5 мл 1М раствора глицерина	

9. Для проверки жизнеспособности клеток провести плазмолиз. Для этого тонкие срезы анализируемого материала поместить на 10 мин в 8%-й раствор NaCl. Затем препарат рассмотреть под микроскопом (увеличение $\times 40$).

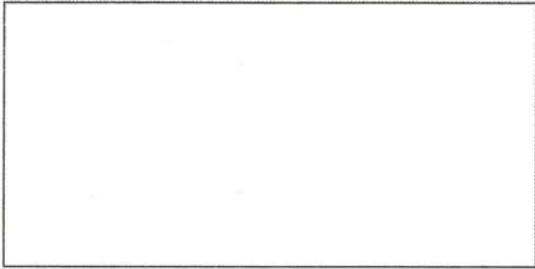
Дистиллированная вода



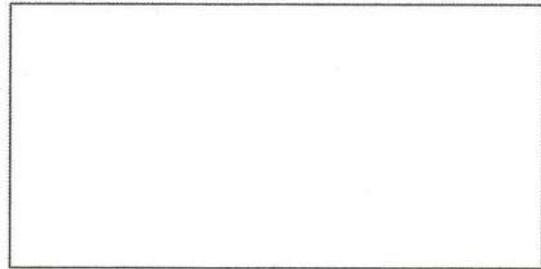
1М раствор сахарозы с водой



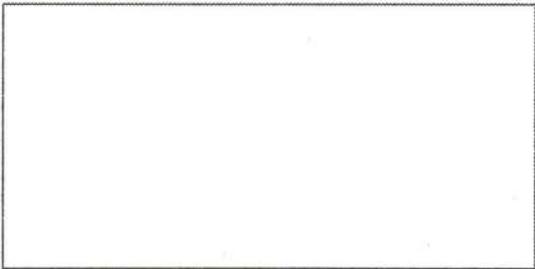
1М раствор сахарозы



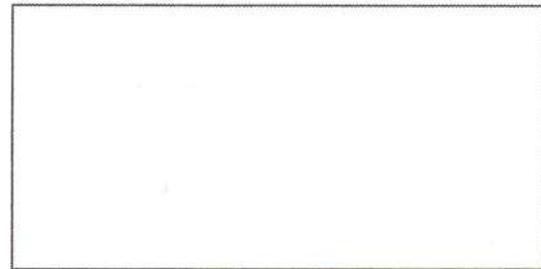
1М раствор глицерина с водой



1М раствор глицерина



1М раствор сахарозы/глицерина



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

13. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Выделение и определение концентрации бактериальной ДНК

Цель: познакомиться с методом фенольно-хлороформного выделения ДНК из бактериальных клеток (*E. coli*) 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 *E. coli*.
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 ее 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 депротеинизация клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа;

Задание 2. Выделите ДНК из клеток *E. coli* с помощью фенольно-хлороформного метода.

Материалы и оборудование: TE буфер, 5%-й раствор додецилсульфата натрия, лизоцим, фенол, хлороформ, изопропанол, дозаторы объемом 200—1000 мкл и 5—50 мкл, спирт этиловый 80%-й, микроцентрифуга, вортекс.

Ход работы (все работы выполнять в ламинарном шкафу!):

1. Из пробирки с суточной культурой *E. coli* перенести пипеткой Пастера 1,0 мл взвеси клеток в пластиковую пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл.

2. Осадить клетки микроорганизмов 5-мин центрифугированием при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

3. Удалить супернатант (вылить питательную среду через край в слив). К осадку клеток микроорганизмов добавить 300 мкл TE буфера и ресуспензировать клетки с помощью дозатора.

4. К суспензии клеток добавить 100 мкл 5%-го раствора додецилсульфата натрия (SDS) и перемешать переворачиванием пробирки 3 раза.

5. К суспензии клеток добавить 100 мкл лизоцима (100 мкг/мл), инкубировать 15 мин при температуре 37 °С.

6. К суспензии клеток добавить 600 мкл изопропанола, перемешать переворачиванием пробирки 3 раза, центрифугировать в течение 10 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

7. Осторожно с помощью дозатора удалить супернатант в слив, к осадку добавить 300 мкл TE буфера, ресуспензировать.

8. Быстро перенести полученный раствор в эппендорф с 200 мкл хлороформа, эппендорф закрыть, смесь перемешать переворачиванием до образования стойкой эмульсии, инкубировать 5 мин при нормальных условиях. Центрифугировать 10 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

9. Верхний водный слой, содержащий ДНК (до белесого кольца белков) перенести микропипеткой в чистую 1,5-мл пробирку типа эппендорф.

10. Добавить в пробирку с ДНК 500 мкл изопропанола, перемешать, инкубировать 5 мин при нормальных условиях, центрифугировать 5 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

11. ДНК в виде белых нитей располагается на дне пробирки. Осторожно удалить 1/2 надосадка в слив, к осадку добавить 500 мкл 80%-го этилового спирта, перемешать с помощью дозатора, центрифугировать 5 мин при 4 °С, 10 тыс. об./мин.

12. Аккуратно удалить весь спирт с помощью дозатора, осадок высушить «на воздухе» при открытой крышке эппендорфа.

13. К осадку добавить 50 мкл ТЕ-буфера, перемешать, измерить концентрацию ДНК на спектрофотометре.

Задание 3. *Измерьте концентрацию ДНК, выделенной из E. coli 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 двухцепочечной 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

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* ($\text{Chl } a / \text{Chl } b$) также является показателем хроматической адаптации и меняется в ряду растений:

теневыносливые → светлюбивые → 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 основные методы разделения смеси пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений. Дайте краткую характеристику каждого метода.*

3. К растертой массе прилить чистый этиловый спирт, доводя объем до 20 мл, тщательно перемешать, накрыть фильтровальной бумагой и дать настояться 5 мин.

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° 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 вытяжку с той стороны, откуда падает свет (то есть в отраженном свете). Отметить окраску.

Окраска спиртовой вытяжки хлорофилла в проходящем свете		Окраска спиртовой вытяжки хлорофилла в отраженном свете
Невооруженным глазом	Через синий светофильтр	

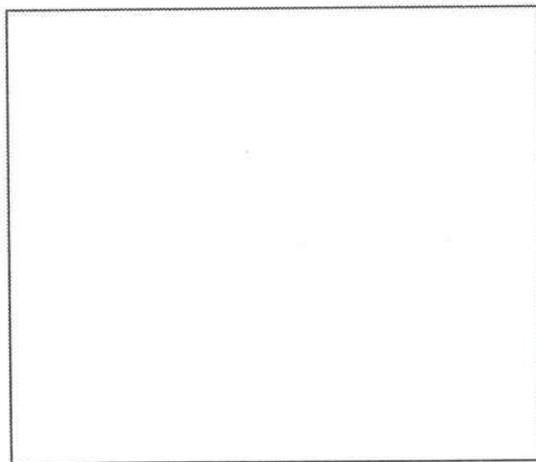
Сделать заключение об оптических свойствах хлорофилла.

Задание 3. *Разделите пигменты фотосинтетического аппарата высших растений методом бумажной хроматографии.*

Материалы и оборудование: спиртовая вытяжка пигментов, химически стаканчик, фильтровальная бумага, ножницы, стеклянная палочка.

Ход работы:

1. Вырезать полоску фильтровальной бумаги 2×15 см. На расстоянии 1—1,5 см от узкого края сделать черту простым карандашом.
2. Налить небольшое количество вытяжки пигментов в новый стаканчик и погрузить в нее полоску под углом $30\text{—}60^\circ$ к стенке стакана.
3. Бумагу в стакане с вытяжкой оставить на 10—15 мин, затем аккуратно достать и просушить.
4. Зарисовать полученную на полоске хроматограмму и сделать вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.



Задание 4. Изучите химические свойства хлорофилла.

Материалы и оборудование: этиловый спирт, 20%-е NaOH или KOH, 10%-я соляная кислота в капельнице, уксуснокислая медь.

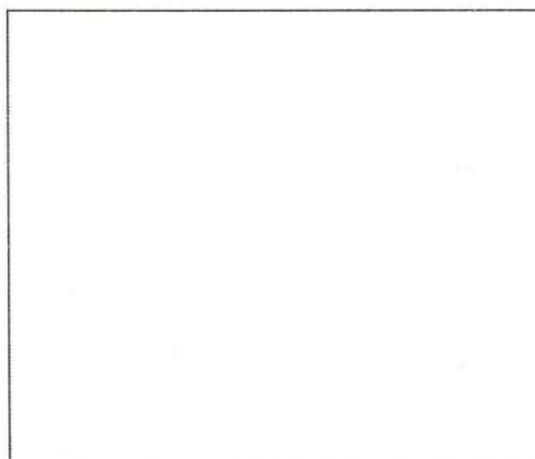
Ход работы:

1. В пробирку с 2—3 мл спиртового раствора пигментов прилить 1 мл 20%-го раствора NaOH, взболтать.

2. После смешивания экстракта со щелочью пробирку поместить на кипящую водяную баню. Как только раствор закипит, пробирку вынуть и охладить.

3. К охлажденному раствору добавить равный объем бензина и несколько капель воды для лучшего разделения смеси. Затем содержимое пробирки резко встряхнуть и дать ему отстояться.

4. По окончании опыта зарисовать окраску слоев, указав распределение пигментов.



5. Написать реакцию омыления эфирных групп хлорофилла.

6. В пробирку налить 2—3 мл спиртовой вытяжки хлорофилла.

7. К вытяжке пигментов добавить одну-две капли 20%-й HCl и осторожно перемешать. Отметить изменение окраски.

8. В эту пробирку добавить один-два 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 расчета 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%-й спирт).

15. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Определение токсичности проб воды и снега на основе измерений интенсивности свечения реагента энзимоллюм

Цель: познакомиться с биолюминесцентным методом определения токсичности проб воды и снега путем измерения интенсивности свечения реагента энзимоллюм.

Задачи:

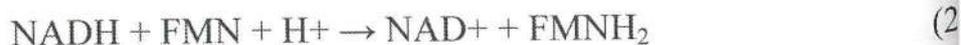
1. Ознакомиться с принципом работы реагента энзимоллюм.
2. Изучить процесс биолюминесценции и ее примеры в живом мире.
3. Освоить метод определения токсичности различных проб на основе измерений интенсивности свечения реагента энзимоллюм.
4. Выполнить задания к лабораторной работе.

Реагент энзимоллюм 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 энзимолном в дистиллированной воде (контроль) и тестируемых пробах (опыт). Токсическое действие исследуемых проб на реагент энзимолном определяется по изменению интенсивности биолюминесценции за 2-мин период экспозиции. Критерием токсичности тестируемой пробы является снижение на 20 % и более (ингибирование) величины максимальной интенсивности свечения реагента при воздействии химических веществ, присутствующих в пробе, по сравнению с максимальной интенсивностью свечения реагента в дистиллированной воде.

Количественная оценка степени влияния тестируемой пробы на интенсивность свечения реагента энзимолном выражается в виде безразмерной величины — люциферазного индекса токсичности ЛИТ, определяемой по формуле

$$\text{ЛИТ} = \frac{(I_k - I_0)}{I_k} 100 \%,$$

где I_k — максимальная интенсивность свечения реагента энзимолном в контрольной пробе; I_0 — максимальная интенсивность свечения реагента энзимолном в опытной пробе.

Задание 1. *Что такое биолюминесценция? Приведите примеры живых организмов, обладающих данным свойством, охарактеризуйте молекулярные механизмы биолюминесценции.*

Задание 2. Проведите определение токсичности снега / моющего средства с помощью реагента энзимолюм.

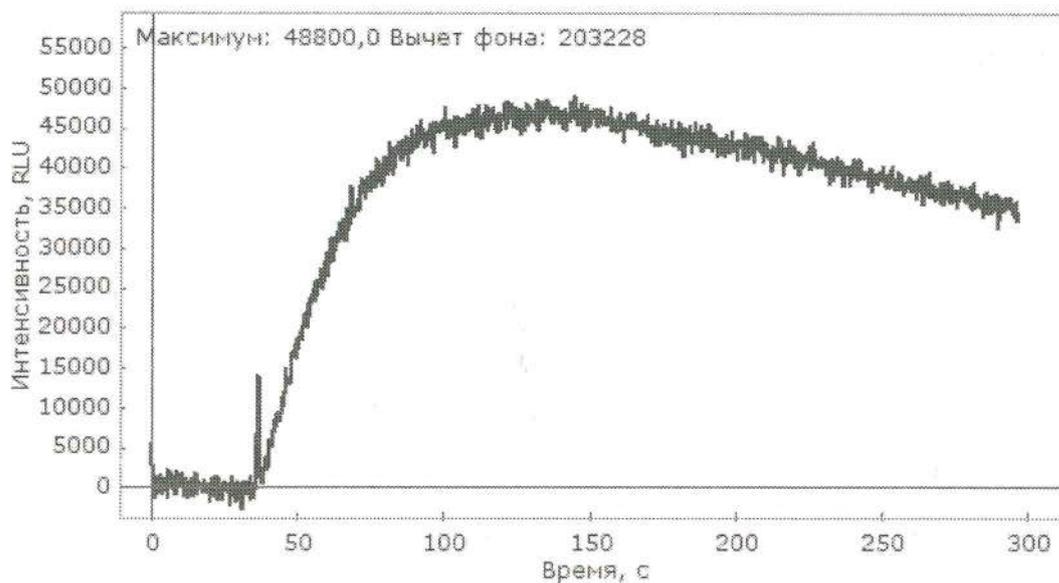
Материалы и оборудование: реагент энзимолюм, дистиллированная вода, снег, флавинмононуклеотид, биолуминометр и кюветы к нему, автоматические дозаторы на 10 и 300 мкл и наконечники к ним, мерные стаканчики, мерный цилиндр.

Ход работы (поддерживать температуру всех проб на уровне 25 °С!):

1. В мерный стаканчик на 50 мл налить дистиллированной воды — контрольная проба.
2. Во второй стаканчик 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 с.
6. В две чистые кюветы пинцетом внести один диск реагента энзимолюм, добавить 300 мкл дистиллированной воды.
7. Начать измерение, нажав на старт, через 5—10 с. нажать «Вычесть фон».

8. Добавить в 1-ю кювету 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Кювету поместить в биолюцинометр, закрыть крышку и зарегистрировать максимальную интенсивность свечения реагента в контрольной пробе I_k (в течение 2 мин).

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 две чистые кюветы пинцетом внести по два диска реагента энзимолум, добавить 300 мкл растаявшего снега в самом высоком разведении (50 раз).

11. Начать измерение, нажав на старт, через 5—10 с нажать «Вычисть фон».

12. Добавить в кювету 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Кювету поместить в биолюцинометр, закрыть крышку прибора и зарегистрировать максимальную интенсивность свечения реагента в опытной пробе I_o (в течение 2 мин).

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

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

15. Провести аналогичные измерения для разведений снега 1 : 10, 1 : 2 и без разведения. Данные занести в таблицу:

Кратность разбавления пробы	I_1	I_2	$I_{\text{ср.}}$	ЛИТ
Контроль				
1				
2				
10				
50				

16. Определить токсичность снега по схеме:

Соответствие кратности разбавления тестируемой пробы воды или почвы и токсикологических характеристик качества тестируемой пробы

Кратность разбавления тестируемой пробы	Токсикологические характеристики качества тестируемой пробы
1	Нетоксичная
2	Слаботоксичная
От 3 до 10	Токсичная
От 11 до 50	Сильнотоксичная
> 50	Гипертоксичная

17. Сделать заключение об уровне токсичности исследуемой пробы.

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 совершенен — 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 его преимущества.

Задача 7

Какие микроорганизмы используются в качестве продуцентов при получении генно-инженерного 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? Дайте их краткую характеристику.

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? Каково 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 с его дефектом, а наоборот, с гиперпродукцией продуктов нормальной функцио-

нально 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 выдвинута концепция создания инновационных лекарственных средств, получивших общее название «антисмысловые олигонуклеотиды». Что такое антисмысловые олигонуклеотиды? Как их получают? Какие трудности возникают при их использовании?

Задача 13

На фармацевтическом рынке присутствуют диагностические тесты на основе моноклональных антител. Что это такое? Как их 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 физическом и генетическом уровне гарантируют безопасность работы со штаммом-продуцентом?

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Клунова, С. М. Биотехнология : учеб. для вузов / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. — М. : Академия, 2010. — 255 с.
2. Неверова, О. А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения / О. А. Неверова, Г. А. Гореликова, В. М. Позняковский. — Новосибирск : Сиб. университет. изд-во, 2007. — 416 с.
3. Сазыкин Ю. О. Биотехнология : учеб. пособие для вузов / Ю. О. Сазыкин. — 3-е изд., стер. — М. : Академия, 2008. — 256 с.

Дополнительная литература

4. Волова, Т. Г. Экологическая биотехнология : учеб. пособие для ун-тов / Т. Г. Волова. — Новосибирск : Сиб. хронограф, 1997. — 141 с.
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак ; под ред. Н. К. Янковского ; пер. с англ. Н. В. Баскакова [и др.]. — М. : Мир, 2002. — 589 с.
6. Имобилизованные клетки микроорганизмов : учеб. пособие / А. П. Сеницын [и др.]. — М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 1994. — 288 с.
7. Нетрусов, А. И. Микробиология : учеб. для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Академия, 2012. — 379 с.
8. Терентьев, В. И. Биотехнология очистки воды : в 2 ч. Ч. 1 / В. И. Терентьев, Н. М. Павловец. — СПб. : Гуманистика, 2003. — 270 с.
9. Шугалей, В. С. Биотехнология : учеб. пособие для студентов / В. С. Шугалей. — Ростов-н/Д. : РИНЯЗ, 2001. — 84 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

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.

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 инициалы 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 (заимствованной) мыслью должна стоять ссылка на литературный источник.**

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

Список литературы должен содержать сведения об источниках, использованных при составлении отчета. Сведения об источниках приводятся строго в соответствии с требованиями **ГОСТ 7.1.**

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):**

020400.62 «Биология»

(наименование направления (специальности))

Дисциплина:

Введение в биотехнологию

(наименование дисциплины)

РЕФЕРАТ

ТЕМА

ВЫПОЛНИЛ СТУДЕНТ

Фамилия, имя, отчество

Академическая группа
Формы обучения

Курс

(подпись)

«__» _____ 201_г.

ПРОВЕРИЛ(А)

Фамилия, имя, отчество

Филиппова

Юлия Юрьевна

Ученая степень

кандидат биологических наук

Ученое звание

доцент

Должность

доцент кафедры микробиологии,
иммунологии и общей биологии

(оценка)

(подпись)

«__» _____ 201_г.

Челябинск

201_

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 ребра мазком кверху и плавными движениями провести 2-3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с.
6. Нанести на фиксированный мазок генцианвиолет, выдержать 3 мин.
7. Слить краску, залить мазок раствором люголя, выдержать 1 мин.
8. Слить раствор люголя, нанести 96%-й раствор этилового спирта, выдержать 30 с.
9. Промыть тщательно в проточной воде в течение 1 мин.
10. Добавить фуксин, выдержать 2 мин.
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 описаны 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.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Практическая работа	«Основные направления современной биотехнологии. Знакомство с работой в лаборатории биотехнологии»	3
2. Практическая работа	«Биотехнология промышленных производств»	9
3. Лабораторная работа	«Приготовление и методы оценки качества питательных сред»	11
4. Лабораторная работа	«Виды брожений. Спиртовое брожение. Уксуснокислое брожение»	17
5. Лабораторная работа	«Виды брожений. Молочнокислое брожение. Определение кислотности молока»	23
6. Лабораторная работа	«Иммобилизация биокатализаторов включением в гели. Включение клеток дрожжей в гели агара» ...	28
7. Лабораторная работа	«Получение микроорганизмов — продуцентов амилаз»	32
8. Лабораторная работа	«Определение амилалитической активности штаммов — продуцентов амилаз»	35
9. Практическая работа	«Биотехнологии в охране окружающей среды»	40
10. Лабораторная работа	«Периодическое культивирование <i>E. coli</i> в лабораторном ферментере»	42
11. Лабораторная работа	«Количественное определение аскорбиновой кислоты в различных объектах»	49
12. Лабораторная работа	«Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур»	53

13. Лабораторная работа «Выделение и определение концентрации бактериальной ДНК».....	58
14. Лабораторная работа «Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений».....	53
15. Лабораторная работа «Определение токсичности проб воды и снега на основе измерений интенсивности свечения реагента энзимолюм».....	70
ЗАДАЧИ К ИТОГОВОМУ КОЛЛОКВИУМУ	75
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	79
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	80

Учебное издание

РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ
для лабораторных занятий по дисциплине
«ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ»

Составитель **Филиппова Юлия Юрьевна**

Редактор О. Е. Шишмаренкова
Верстка Т. В. Ростуновой

Подписано в печать 17.03.17
Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 10,2. Уч.-изд. л. 3,6.
Тираж 80 экз. Заказ 18.
Бесплатно

Челябинский государственный университет
454001, Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129
Издательство Челябинского государственного университета
454021, Челябинск, ул. Молодогвардейцев, 57б