

**ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені ІВАНА ФРАНКА**

Галина Клепач

БІОТЕХНОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

**Для фахівців першого (бакалаврського) рівня вищої
освіти галузі знань 0401 “Природничі науки” за напрямом
підготовки 6.04.0102 “Біологія”**

Дрогобич

2016

УДК 57:62(07)
ББК 30.16
К 56

Рекомендовано до друку вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка
(протокол № 17 від 17.12. 2015 р.)

Рецензенти:

Голуб Наталія Ярославівна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка;

Монастирська Світлана Семенівна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Відповідальний за випуск: Стахів Василь Іванович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

К 56 **Клепач Г. М. Біотехнологія** : методичні рекомендації до практичних занять [для фахівців першого (бакалаврського) рівня вищої освіти галузі знань 0401 “Природничі науки” за напрямом підготовки 6.04.0102 “Біологія”] / Галина Миколаївна Клепач. – Дрогобич : Видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка, 2016. – 96 с.

Методичні рекомендації написані відповідно до програми навчальної дисципліни “Біотехнологія” для підготовки фахівців першого (бакалаврського) рівня вищої освіти галузі знань 0401 “Природничі науки” за напрямом підготовки “Біологія”, затвердженої вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (протокол № 3 від 26. 02. 2015 р.). Посібник містить матеріал практичних занять, короткі теоретичні відомості до них, завдання до самостійного опрацювання, рекомендовану літературу, словник термінів, додатки.

УДК 57:62(07)
ББК 30.16

ВСТУП

Біотехнологія, що читається для студентів біологічних спеціальностей, – одна із сучасних біологічних наук, яка активно розвивається та доповнюється новими методами і здобутками. Завдяки значним науковим досягненням привертає увагу багатьох дослідників, науковців, учених різних галузей.

Нині нова біотехнологія є одним з пріоритетних напрямів сучасної науки, які забезпечують прискорення науково-технічного прогресу, а також дієвим способом для подолання сировинних, продовольчих, енергетичних, екологічних та економічних проблем. Її використовують при розв'язанні багатьох практичних питань, пов'язаних з підвищенням ефективності охорони здоров'я людей і тварин, збільшенням продовольчих ресурсів та забезпеченням промисловості сировиною, використанням рентабельних поновлювальних джерел енергії й організації безвідходних виробництв, зменшенням шкідливих антропогенних впливів на довкілля та в інших галузях діяльності людини. Тому цілісне формування поглядів сучасного біолога було б неповним без тих знань, які дає наука про потенційні можливості практичного застосування біосистем у народному господарстві.

Предметом зазначеного курсу є вивчення можливості практичного використання культур клітин бактерій і дріжджів, тварин та рослин для отримання господарсько цінних речовин. Мета курсу – сформулювати уявлення про напрями промислової і сучасної біотехнології, що мають експериментальну основу; ознайомити з основними біотехнологічними процесами, що використовуються для отримання різних біологічно активних речовин; поглибити знання про сучасні принципи та підходи скерованого конструювання одного з компонентів біотехнологічної системи – біологічного агента (продуцента) із використанням рекомбінантної техніки, клітинної, метаболічної і хімічної інженерії.

Курс “Біотехнологія” ознайомлює з історією промислової мікробіології, з видами промислових продуцентів, селекцією та конструюванням біологічних агентів, із традиційними і новітніми технологіями для отримання біологічно активних речовин та продуктів, із розробкою нових біотехнологічних підходів, скерованих на модифікацію біосинтетичних можливостей продуцентів, економічними і соціальними аспектами промислової та новітньої біотехнології.

Важливими завданнями курсу “Біотехнологія” є:

- формування знань про експериментальні відкриття та факти, явища і процеси, методи біотехнології, співвідношення теорії і практики у розвитку сучасної та новітньої біотехнології;
- формування поглядів про можливості біотехнологічних підходів, скерованих на поліпшення екології довкілля;
- розкриття потенційних можливостей сучасних генно-інженерних та молекулярно-біологічних методів, скерованих на конструювання біологічного агента (продуцента).

Значна увага при викладанні курсу приділяється застосуванню новітніх досягнень біотехнології, які направлені на поліпшення добробуту та здоров'я людей, екології навколишнього середовища. Розглянуто використання мікроорганізмів для отримання біопалива, харчових продуктів і біоматеріалів, у сільському господарстві, у переробці відходів.

Викладання курсу “Біотехнологія” базується на раніше отриманих студентами знаннях із “Мікробіології з основами вірусології” про різноманітність мікроорганізмів, особливості їх життєдіяльності; “Біохімії”, де вивчили перебіг метаболічних процесів у клітині; “Генетиці з основами селекції” та “Молекулярній біології”, де опанували генетичні механізми спадковості і мінливості організмів, регуляцію та механізми експресії генів.

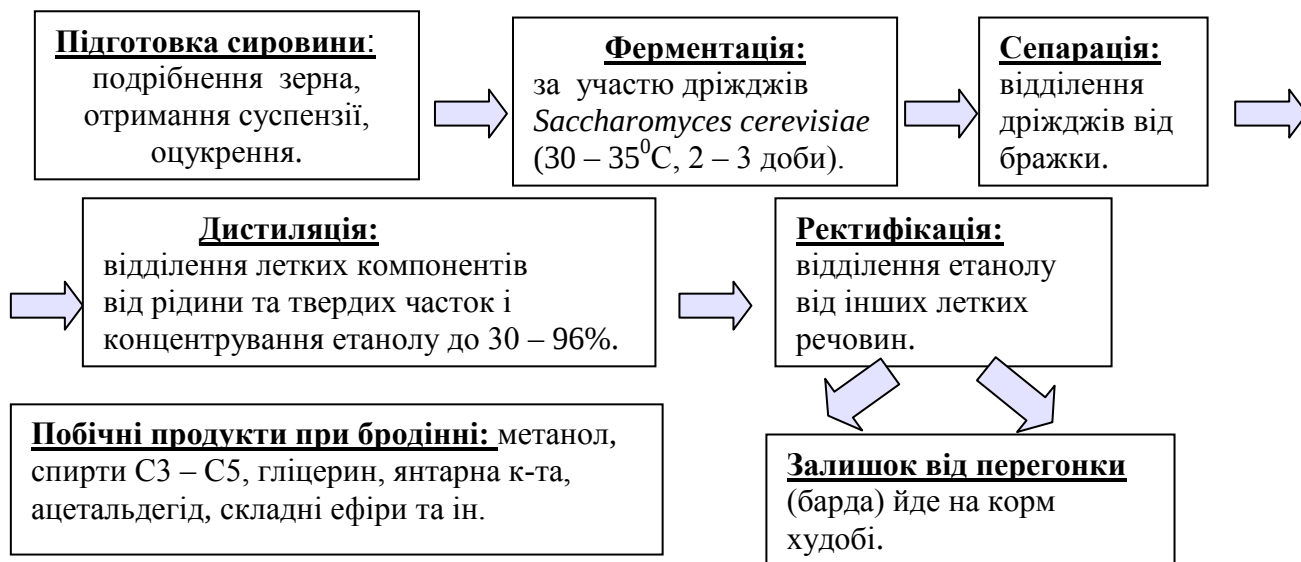
Зазначений курс формує у студентів уявлення про біотехнологію як науку, що має експериментальну основу, ознайомлює з історією важливих відкриттів, появою та розвитком ідей, понять, теорій та законів, методами досліджень, показує внесок українських і зарубіжних вчених у розвиток цієї науки.

Мета посібника – сприяти студентам у засвоєнні нових знань та навичок, закріпити набуті теоретичні знання, розширити і поглибити їх.

На практичних заняттях студенти ознайомляться з промисловими біотехнологічними процесами, шляхами отримання біологічно активних речовин, органічних сполук із використанням мікроорганізмів, із застосуванням досягнень біотехнології для конверсії продуктів фотосинтезу і відходів, у біотрансформації, при отриманні бактерійних добрив та засобів захисту рослин, виробництвом вакцин, діагностичних і лікувальних медичних препаратів, а також візьмуть участь в обговоренні актуальних питань та проблем біотехнології.

Кожне практичне заняття передбачає глибоке і всебічне знання навчального матеріалу, відповідно до якого укладені тематичні завдання різних видів та рівнів складності.

У завданнях одного виду необхідно зобразити технологічну схему отримання речовини, наприклад, етанолу. Для цього студент має попередньо ознайомитися з продуцентами та механізмами і стадіями цього процесу та подати відповідь у такому вигляді:



У завданнях іншого виду студентам потрібно заповнити таблицю чи схему на основі вивченої та самостійно опрацьованої ними теми. Наприклад, у наведеній схемі треба вписати галузі народного господарства, в яких використовуються ті чи ті культури тваринних клітин:



В інших завданнях потрібно заповнити таблицю, наприклад:

Методи введення ДНК у клітини рослин	Принцип методу, його можливості
Трансформація Ті-плазмідною <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ті-плазмиди <i>Agrobacterium tumefaciens</i> зумовлюють перенесення Т-ДНК, яка інтегрується у геном клітини рослин і викликає пухлини. На основі Ті-плазмід сконструйовані Ті-вектори.
Векторні системи на основі Ті-плазмід	Ті-вектори позбавлені генів, що визначають синтез фітогормонів, опінів та генів <i>vir</i> . Вони не можуть самостійно переміщатися у клітини рослин і зумовлювати інтеграцію чужорідних генів у геном рослин. У вектори включено ділянки <i>ori</i> , що визначають їхню реплікацію в <i>E. coli</i> ; правий кінцевий повтор Т-ДНК, необхідний для інтеграції Т-ДНК у геном рослини (деякі вектори містять обидва повтори); полілінкер для клонування генів у Т-ДНК; маркерні гени для бактерійних та рослинних клітин. Є бінарна і коінтегративна векторні системи.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1

Промислові мікроорганізми. Основи культивування промислових культур мікроорганізмів

Мета: ознайомитися з різноманітністю культур мікроорганізмів, які використовуються у промисловій мікробіології для отримання продуктів та біологічно активних речовин, а також із технологічними основами їх культивування, типами і принципами роботи біореакторів.

План заняття

1. Охарактеризуйте основні напрями промислової мікробіології.
2. Історія розвитку промислової мікробіології. Значення робіт Луї Пастера для розвитку промислової мікробіології.
3. Характеристика промислових мікроорганізмів (бактерій, дріжджів, цвілевих грибів та мікроскопічних водоростей) як біотехнологічних об'єктів.
4. Охарактеризуйте поверхневий та глибинний (періодичний і безперервний) способи культивування мікроорганізмів у виробничих умовах.
5. Опишіть види біореакторів та їх конструкцію, що використовуються у промисловій мікробіології.
6. Основні фази росту мікробної культури в реакторах періодичного, хемостатного та турбідостатного типу.
7. Параметри росту, за допомогою яких здійснюється оцінка перебігу технологічного режиму ферментації.

Теоретичні відомості

Термін “біотехнологія” (“біос” – життя, “технос” – мистецтво, майстерність, “логос” – слово, вчення) з'явився у 70-их роках ХХ ст., хоча біотехнологічні принципи людина розробила уже давно: використовуючи життєдіяльність мікроорганізмів, випікала хліб, виготовляла сир та інші молочні продукти, вино, оцет, пиво, реалізовувала різні способи переробки шкіри, рослинних волокон та ін. Згідно з визначенням Європейської біотехнологічної федерації (EFB), створеної у 1978 р., біотехнологія є такою інтеграцією природничих та інженерних наук, за допомогою якої використання клітин, клітинних структур та окремих біомолекул дає можливість одержувати якісніші і дешевші продукти медичного та промислового призначення, які важливі для життя і добробуту людей і уможливлють низьке енергоспоживання. У своїй основі біотехнологія є синтезом таких наук, як мікробіологія, біохімія, молекулярна біологія, генетика, органічна, аналітична й неорганічна хімія, фізична хімія та електрохімія, хімічна технологія тощо. Біотехнологію умовно поділяють на два напрями: традиційну, або промислову (технологічна мікробіологія, технічна, біохімічна та інженерна ензимологія), і сучасну (генетична і клітинна інженерія).

Промислова мікробіологія – це наука про важливі мікробіологічні процеси, технологію отримання промисловим шляхом корисних продуктів, біомаси мікроорганізмів, які використовуються у різних галузях народного господарства і медицині. Основу цієї науки складає мікробіологічна технологія – один із розділів сучасної мікробіології. Її засновником був видатний російський мікробіолог академік В.М. Шапошников (1884 – 1968). Цей розділ мікробіології розглядає теоретичні і розв’язує практичні проблеми виробництва великої кількості продуктів, що утворюються в результаті мікробіологічного синтезу.

Промислова мікробіологія базується на ферментації мікроорганізмів: міксоміцетів, дріжджів, бактерій – представників різних фізіологічних і таксономічних груп, які різняться як за типом метаболізму, так і за типом живлення. Незважаючи на велику різноманітність агентів, що використовують у біотехнологічних маніпуляціях, основними об’єктами біотехнології все-таки залишаються мікроорганізми. Останні, маючи широкий набір різноманітних ферментних систем, здатні утворювати у процесі життєдіяльності різні продукти обміну, необхідні для практичної діяльності людини. Мікроорганізми використовуються для біосинтезу практично важливих метаболітів (амінокислот, органічних кислот, ферментів, екзополісахаридів, лектинів, поверхнево-активних речовин, вітамінів, стимуляторів росту, гормонів); одержання білкових продуктів, пробіотиків і добрив (препарати на основі біомаси); одержання енергії (біогазу); вилуговування металів із руд. Одним із нових розділів промислової мікробіології є трансформація різних природних і хімічно синтезованих речовин за допомогою мікроорганізмів для отримання більш цінних препаратів, які використовуються насамперед у медичній практиці, а також для очистки відходів низки виробництв від токсичних сполук [наприклад, у біологічній трансформації стероїдів (зі стероїдної сировини отримують кортизон, гідрокортизон, преднізолон та інші фармацевтичні препарати), антибіотиків, сполук піридинового ряду, синтезі ефедрину, виробництві напівсинтетичних пеніцилінів]. Ще одним перспективним напрямом промислової біотехнології є використання мікроорганізмів для отримання засобів захисту рослин від шкідників, а також для отримання вакцин.

Продукти метаболізму мікроорганізмів застосовуються у різних галузях. Наприклад, у кондитерській промисловості широко використовують лимонну кислоту, яку отримують у результаті життєдіяльності селекціонованих штамів мікроорганізмів. Ширшим стає асортимент ферментів – протеаз, нуклеаз, амілаз, глюкоамілаз, каталаз, які продукують мікроорганізми; деякі з них (наприклад, нуклеази) використовують у генній інженерії.

Культивування мікроорганізмів – це метод створення штучних умов для підтримки процесів життєдіяльності й розмноження мікроорганізмів *in vitro*. Для цього застосовують живильні (культуральні) середовища, які мають відповідати певним стандартам, створюючи оптимальні умови для росту, розмноження й життєдіяльності мікроорганізмів. До складу середовищ потрібно ввести джерела живильних речовин і води, а також ростові фактори

(вітаміни, ферменти). Універсальним їх джерелом слугують екстракти з білків тваринного й рослинного походження, білкові гідролізати. Для мікроорганізмів із більш складними харчовими потребами до складу середовищ включають нативні субстрати – кров, сироватку, асцитичну рідину, яєчний жовток, кусочки печінки, нирок, мозкової тканини та ін.

Середовища мають бути збалансованими за мікроелементним складом і містити йони Феруму, Купруму, Мангану, Цинку, Кальцію, Натрію, Калію та мати у своєму складі неорганічні фосфати. Залежно від своєї густини, середовища поділяються на рідкі, напіврідкі та щільні, а за походженням – на природні й штучні. Залежно від потреб бактеріологів існуючі живильні середовища охоплюють чотири основні групи: I) універсальні (прості); II) спеціальні; III) елективні та IV) диференційно-діагностичні.

Середовища, які використовуються для культивування мікроорганізмів, мають бути простерилізовані. **Стерилізація** (від лат. *sterilis* – безплідний, вільний від бактерій) – повне знищення вегетативних і спорових форм усіх мікроорганізмів на предметах, матеріалах, у живильних середовищах. У лабораторних та виробничих умовах залежно від виду і складу середовища використовують відповідні види стерилізації: текучою парою, парою під тиском в автоклаві, сухим жаром, кип'ятіння, пастеризацію, тиндалізацію, хімічну та механічну.

Розрізняють два способи культивування мікроорганізмів – поверхневий і глибинний. За поверхневого способу мікроорганізми вирощують на поверхні тонкого шару рідкого чи твердого середовища, а за глибинного – в об'ємі рідкого середовища. Глибинне культивування може бути періодичним і безперервним. За періодичного – змінюються як швидкість росту, так і фізіолого-біохімічні та морфологічні характеристики культури. За цих умов культура мікроорганізмів проходить певний цикл розвитку, для якого притаманна певна зміна фаз, або періодів: лаг-фаза, експоненціальна (логарифмічна), стаціонарна та фаза відмирання. У напіввиробничих і виробничих умовах широкого застосування набуло **безперервне культивування**, за якого культура мікроорганізмів підтримується тривалий час у стані експоненціального росту. Під **ростом** розуміють координоване відтворення бактеріальних клітин і, відповідно, збільшення мікробної маси.

Культивування мікроорганізмів у лабораторних умовах здійснюють у скляному посуді різного об'єму в термостатах, у промислових – у ферментерах різного об'єму. **Ферментер**, або **біореактор**, – апарат, оснащений спеціальним набором інструментів для контролю та росту мікробної маси. Розрізняють механічні, аерліфтні і газо-вихрові біореактори, а також аеробні, анаеробні та комбіновані – аеробно-анаеробні. У виробництві для культивування аеробних мікроорганізмів використовують ферментери, оснащені мішалкою і нагнітачем повітря. Анаеробні бактерії вирощують на середовищах у спеціальних апаратах – **анаеростатах**, анаеробних боксах і у спеціальному герметичному посуді в атмосфері азоту або інертних газів (переважно аргону). Фототрофні бактерії потребують світла, тому для їхнього вирощування застосовують термостати, оснащені лампами денного світла, – **люміненстати**.

Найважливішим завданням будь-якого біотехнологічного процесу є розробка й оптимізація технології й апаратури для нього. Кожний біологічний об'єкт (клітина, фермент) – це автономна саморегульована система. Природа біологічних процесів складна й далеко не з'ясована остаточно. Загалом будь-який біотехнологічний процес включає три основні стадії: передферментаційну, ферментаційну й постферментаційну.

Практичні завдання

1. Ознайомтесь із видами промислових штамів мікроорганізмів, їхнім використанням та заповніть таблицю.

Промислові продуценти	Штами промислових продуцентів	Речовини та/ чи продукти, які отримують мікробіологічним синтезом
Бактерії:		
Дріжджі:		
Цвілеві гриби:		
Мікроскопічні водорості:		

2. Заповніть таблицю, де зазначте переваги мікроорганізмів порівняно з вищими організмами, які використовуються для синтезу біологічно активних сполук.

Продуценти біологічно активних сполук	Переваги	Недоліки
Мікроорганізми: – бактерії – дріжджі – цвілеві гриби – водорості		
Вищі організми: – тварини – рослини		

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Мікроорганізми здатні утворювати у процесі життєдіяльності різні продукти обміну, які є цінними для діяльності людини завдяки набору різних:

- а) ферментів;
- б) нуклеїнових кислот;
- в) вторинних метаболітів.

2. Які типи бродіння досліджував Луї Пастер:

- а) спиртове; б) молочнокисле;
- в) маслянокисле; г) оцтовокисле;
- д) мурашинокисле; е) пропіоновокисле.

3. Хто вперше виявив антибіотичну продуктивність мікроорганізмів:

- а) А.Флемінг; б) Г. Флорі та Е.Чейн;
- в) З.Ваксман; г) О.Єрмольєва;
- д) М.Заболотний; е) С.Виноградський.

4. Хто і коли відкрив продуценти стрептоміцину:

- а) А.Флемінг у 1929 р.;
- б) Г.Флорі та Е.Чейн у 1940 р.;
- в) З.Ваксман у 1944 р.;
- г) З.В.Єрмольєва у 1942 р. ;
- д) Д.К. Заболотний у 1928 р.

5. Назвіть львівського вченого, з яким пов'язане вивчення біосинтезу рибофлавіну дріжджами:

- а) В.Пігорський; б) Г.Шавловський;
- в) А.Ситников; г) В.Білай;
- д) В.Шапошников; е) С.Виноградський.

6. Хто вперше розробив технології мікробіологічних виробництв:

- а) Л.Пастер; б) А.Лавуазьє;
- в) Р.Кох; г) А. ван Левенгук;
- д) С.Виноградський; е) Д.Заболотний.

7. Назвіть вченого, який започаткував розвиток промислової мікробіології в Україні:

- а) В.Пігорський; б) Г.Шавловський;
- в) Д.Заболотний; г) Л.Рубенчик;
- д) В.Шапошников; е) С.Виноградський.

8. Назвіть автора теорії фізіологічної двофазності бродіння і дослідника динаміки процесів бродіння:

- а) В.Омелянський; б) Г.Шавловський;
- в) Д.Заболотний; г) Л.Рубенчик;
- д) В.Шапошников; е) Л. Пастер.

9. Назвіть співавтора розробки наукових основ бродіння тіста:

- а) В.Омелянський; б) С.Лебедев;

- в) Д.Заболотний; г) Л.Рубенчик;
д) В.Шапошников; е) Л. Пастер.

10. Назвіть ученого, який ввів у практику безперервний метод культивування мікроорганізмів:

- а) В.Омелянський; б) С.Лебедєв;
в) Д.Заболотний; г) Л.Рубенчик;
д) В.Шапошников; е) О.Єрмольєва.

11. Періодичне культивування...:

- а) використовується для отримання біомаси;
б) відбувається шляхом поверхневого і глибинного культивування;
в) передбачає, що культура підтримується в експоненціальній фазі росту;
г) полягає в тому, що джерело вуглецю вносять у ферментер безпосередньо перед засіванням культури.

12. Виберіть способи стерилізації повітря, яке подається у ферментер:

- а) газове очищення (седиментація, механічна фільтрація, апарати мокрого очищення);
б) використання антисептиків (фенол- і ртутьумісних речовин);
в) підвищення чи зниження температури;
г) УФ-опромінення, іонізуюче опромінення.

13. Виберіть етапи приготування посівного матеріалу:

- а) вихідна культура → скошене агаризоване середовище → вирощування у колбах у рідкому середовищі → посівні апарати → стадія виробничої ферментації;
б) вихідна культура → посівні апарати → стадія виробничої ферментації;
в) скошене агаризоване середовище → вирощування у колбах у рідкому середовищі → стадія виробничої ферментації;
г) вихідна культура → вирощування у колбах у рідкому середовищі → посівні апарати → стадія виробничої ферментації.

14. Які з наведених тверджень стосовно неперервного способу культивування є правильними?

- а) використовують для отримання метаболітів;
б) розчини джерела вуглецю та солей постійно вводять у ферментер;
в) об'єм культури змінюється;
г) під час культивування із середовища видаляють продукти метаболізму.

15. Як слід вибирати оптимальні дози мутагенів під час селекції мікроорганізмів?

- а) найбільшу з можливих доз, при якій організм має виживання 100%;
б) найменшу з можливих доз, при якій спостерігається максимальна частота мутантів;
в) найбільшу з можливих доз, при якій спостерігається максимальна частота мутантів;
г) що більша частка клітин гине після дії мутагена, то більше буде мутантів серед тих клітин, що вижили.

16. Назвіть методи зберігання промислових культур:

- а) періодичні пересіви (субкультивування);

- б) зберігання при низьких та ультранизьких температурах;
 - в) висушування (просте і ліофілізація);
 - г) зберігання під мінеральною оливою.
17. Основне завдання зберігання промислових культур – це:
- а) підтримка їх життєдіяльності;
 - б) забезпечення культур киснем;
 - в) збільшення швидкості росту;
 - г) збереження стабільності і таксономічно важливих ознак та властивостей.
18. Економічний коефіцієнт визначають за:
- а) відношенням кількості утвореної біомаси до кількості використаного субстрату;
 - б) швидкістю метаболізму;
 - в) питомою активністю культури;
 - г) нагромадженою біомасою.
19. Ознаки біореакторів із механічним перемішуванням:
- а) повітря розподіляється у колоні за використання мішалок;
 - б) повітря подають у культуральне середовище під тиском у нижню частину реактора;
 - в) повітря подають у культуральне середовище під тиском у нижню частину вертикального каналу;
 - д) малі розміри (100 – 300 л).
20. Барботажні колони характеризуються тим, що:
- а) повітря розподіляється у колоні за використання мішалок;
 - б) мають малі розміри (100 – 300 л);
 - в) повітря подають у культуральне середовище під тиском у нижню частину вертикального каналу;
 - д) повітря подають у культуральне середовище під тиском у нижню частину реактора.

Завдання для самоконтролю

1. Біотехнологія як наука. Основні складові біотехнології.
2. Значення біотехнології. Роль біотехнології у розв'язанні екологічних проблем.
3. Промислова мікробіологія як наука. Історія розвитку промислової мікробіології.
4. Джерела промислових мікроорганізмів. Способи виділення продуцентів із природних джерел.
5. Методи зберігання промислових культур та способи отримання посівного матеріалу (інокуляту) у виробничих умовах.
6. Основні стадії типового промислового мікробіологічного процесу.
7. Види середовищ для культивування мікроорганізмів та способи їх стерилізації.
8. Методи руйнування клітин промислових культур мікроорганізмів.

9. Методи екстракції та очистки біологічно активних речовин.
10. Товарні форми промислових продуктів.
11. Назвіть вітчизняні та зарубіжні промислові мікробіологічні центри і фірми.

Література

1. Биотехнология. Принципы и применение : пер с англ. / под ред. Хиггинса И., Беста Д., Джонса Дж. – М. : Мир, 1988. – С. 8 – 60; 91.
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін./ за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 15 – 22.
3. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 8 – 21.
4. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 16 – 46.
5. Егоров Н.С. Биотехнология : учеб. пособие для вузов / Н.С. Егоров, А.В. Олексин, В.Д. Самуилов. – В 8 кн. / под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – Кн. 1 : Проблемы и перспективы. – М. : Высш. школа, 1987. – С. 122 – 150
6. Квасников Е.И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е. И. Квасников, И.Ф. Щелокова. – К. : Наукова думка, 1991. – С. 154 – 320.
7. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 9 – 12; 39 – 46.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

Біотехнологія продуктів бродіння та білка одноклітинних

Мета: ознайомитися з біотехнологічними процесами отримання деяких харчових продуктів (шляхом бродіння) та білка одноклітинними мікроорганізмами.

План заняття

1. Характеристика технологічного процесу отримання етанолу та промислових продуцентів спирту.
2. Характеристика технологічного процесу отримання оцту і промислових продуцентів оцтової кислоти.
3. Біотехнологічні процеси отримання кефіру, ряжанки, йогурту за використання молочнокислих мікроорганізмів.
4. Характеристика технології сироваріння.
5. Характеристика технологій отримання вина, пива, міцних спиртових напоїв.
6. Характеристика видів мікроорганізмів, перспективних для отримання кормового та харчового білка.

Теоретичні відомості

До промислових процесів, у яких використовуються мікроорганізми, належить низка виробництв (насамперед такі найдавніші виробництва, як випікання хліба, виноробство, пивоваріння, отримання оцту, молочнокислих продуктів (простокваші, кефіру, кумису, йогуртів, сирів тощо)). Багато з перелічених виробництв існували у відносно широких масштабах ще до того, як були отримані перші дані про мікроорганізми – збудники вказаних процесів. Заквасками для цих виробництв використовувались мікроорганізми, які випадково потрапляли і розмножувалися безпосередньо у самій сировині. Проте тільки згодом, після того як виділили мікроорганізми, що здійснюють спиртове, молочнокисле і пропіоновокисле бродіння, глибоко й детально вивчили їхні фізіологічні та біохімічні особливості, названі процеси були взяті під строгий науковий контроль спеціалістів-мікробіологів. Зокрема, при виготовленні молочнокислих продуктів використовують спеціальні закваски, якими інокуюють попередньо підготовлену сировину (молоко, сир та ін.), що дає змогу отримувати продукти потрібної якості. Застосовувані при цьому культури живих бактерій можуть бути представлені одним штамом певного виду (культури моноштамів) чи кількома штамми і/чи видами (багатоштамові або змішані культури). Комерційні культури-закваски містять бактерії, які утворюють молочну кислоту і пахучі речовини.

Промислова мікробіологія забезпечує різні галузі народного господарства молочною, масляною та лимонною кислотами, етанолом і бутанолом, ацетоном

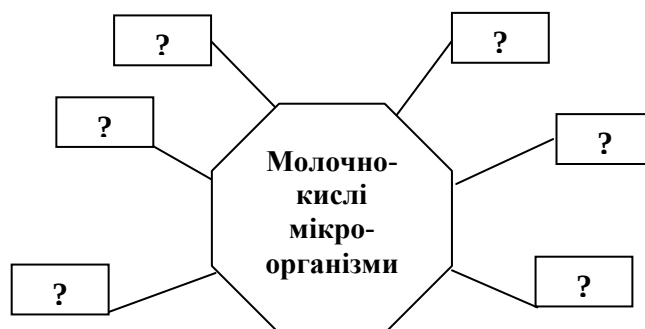
та іншими продуктами бродіння. В організації і становленні промислового отримання цих речовин у нашій країні, зокрема молочної кислоти, бутанолу й ацетону, вирішальну роль мали дослідження В.Шапошникова та його учнів Н.Ієрусалимського і М.Бехтерової; виробництво лимонної кислоти зв'язано з іменами С.Костичева та В.Буткевича.

Особливо великого розмаху останніми десятиліттями отримало виробництво мікробного білка – надзвичайно необхідного продукту, який особливо широко використовується у сільському господарстві. Цей цінний продукт отримують шляхом вирощування мікроорганізмів на нехарчових субстратах (парафінах, відходах молочної і м'ясної промисловості). Перспективним є розширення виробництва мікробного білка за використання одновуглецевих сполук, зокрема метану і метанолу. Хороші результати отримують і при використанні етанолу як джерела вуглецю. Застосування таких джерел вуглецю, як метан, метанол, етанол, дає змогу вирощувати мікробну масу без будь-яких посторонніх домішок, що має суттєве значення. Особливість білка одноклітинних організмів (БОО) полягає в тому, що цей продукт практично повністю складається з мікробної біомаси і, по-друге, у його виробництві нерідко використовують мікроби, досвід застосування яких ще малий та які раніше при виготовленні продуктів харчування не вживались. Правила оцінки шкідливості і способи тестування продуктів, які призначені на виготовлення кормів, менш жорсткі, а роль етичного фактора незначна. Тому пріоритет у розвитку виробництва БОО був зроблений на користь виготовлення кормів для тварин. До БОО-продуктів, що виготовляються промисловістю як корм для тварин, належать прутин фірми ICI (біомаса бактерій *Methylophilus methylotrophus*, вирощених на метанолі), Торгіна фірми ВР (дріжджі, вирощені на *n*-алканах) і грибна маса, отримувана за технологією фірми Finish Pekilo. Усі ці БОО випускаються у вигляді слабкозabarвлених порошків.

БОО-продукти, призначені для їжі, нечисленні. До них належить давно використовуваний дріжджовий екстракт (гідролізат пекарських дріжджів), що застосовується у невеликих кількостях як вітамінна і смакова приправа. Під час Другої світової війни у Німеччині вирощували дріжджі *Candida*, проте це виробництво не отримало подальшого розвитку. У 80-х роках ХХ ст. фірма Hoechst почала випускати продукт, що містить 90% білка, на основі бактерій, вирощених на метанолі. Останній, за попередніми даними, має високу харчову цінність. Один із нових офіційно дозволених харчових білків мікробного походження – мікопротеїн, виробництво якого налагоджено в Англії фірмою Ranks Hovis Mc Dougall. Мікопротеїн – це харчовий продукт, який складається головню із міцелію гриба *Fusarium graminearum*, виділеного із ґрунту.

Практичні завдання

1. Зобразіть технологічну схему отримання етанолу.
2. Зобразіть технологічну схему отримання оцту.
3. Заповніть схему, у якій вкажіть речовини і продукти, що отримують за використання молочнокислих мікроорганізмів:



4. Заповніть таблицю, у якій зазначте особливості перебігу етапів під час виноробства, пивоваріння, виготовлення міцних спиртових напоїв (горілки, коньяку, рому, саке).

Сировина	Підготовка до процесу	Процес	Побічні продукти

5. Заповніть таблицю, у якій зазначте види мікроорганізмів, перспективні для отримання кормового та харчового білка.

Види мікроорганізмів – продуценти білків	Вуглецеві субстрати	Назва білка/ білкового продукту

6. Зобразіть схематично схему виробництва кормових дріжджів, на якій відмітьте ферментер, збірники, сепаратори, термообробку, сушку, фасування продукту.

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

- Для біотехнологічного отримання оцтової кислоти :
 - як сировину можуть використовувати зброджений яблучний сік;
 - як продуцент використовують культуру *Acetobacter xylinum*;
 - необхідний високий рівень аерації середовища;
 - для вирощування бактерій *Gluconobacter* необхідне внесення в поживне середовище вітамінів.
- Ацетоно-бутилове бродіння:
 - здійснюють бактерії роду *Clostridium*;
 - іде по фруктозо-дифосфатному шляху;

- в) має 3-фазний характер;
 - г) ріст культури здійснюється в аеробних умовах.
3. Для виробництва етанолу із крохмалевмісної сировини використовують:
- а) *Saccharomyces cerevisiae*;
 - б) *Escherichia coli*;
 - в) *Aspergillus niger*;
 - г) *Bacillus subtilis*.
4. Етиловий спирт:
- а) отримують у промислових масштабах при зброджуванні глюкози за допомогою дріжджів;
 - б) використовують як добавку до пального;
 - в) отримують переважно з меляси;
 - г) отримують з ацетилену.
5. За спиртового бродіння:
- а) найчастіше використовують неперервні технологічні процеси;
 - б) основними продуцентами етанолу є дріжджі;
 - в) дріжджі здатні розщеплювати крохмаль до глюкози та декстринів;
 - г) необхідний попередній гідроліз крохмалю або целюлози до глюкози.
6. Розмістіть стадії виробництва пива у порядку їх здійснення:
- а) зброджування пивного сусла;
 - б) виробництво солоду;
 - в) приготування пивного сусла;
 - г) розлив;
 - д) освітлення.
7. Мікробіологічний контроль спиртового виробництва включає визначення:
- а) вмісту глікогену у дріжджових клітинах;
 - б) ступеня інфікованості сировини (методом прямого мікроскопування);
 - в) якісного і кількісного складу присутніх мікроорганізмів;
 - г) кислотності (титруванням).
8. Методи виготовлення ігристих вин:
- а) ферментативний та класичний;
 - б) класичний і резервуарний;
 - в) трансфера та інжекції;
 - г) буферний та резервуарний.
9. Збудником тягучої (картопляної) хвороби хліба є:
- а) *Serratia marcescens*;
 - б) *Fusarium graminearum*;
 - в) *Bacillus subtilis*;
 - г) *Claviceps purpurea*.
10. Ерготизм викликають мікроорганізми:
- а) *Claviceps purpurea*;
 - б) *Fusarium graminearum*;
 - в) *Bacillus subtilis*;

- г) *Serratia marcescens*.
11. “П’яний хліб” спричиняють мікроорганізми:
- а) *Bacillus subtilis*;
 - б) *Fusarium graminearum*;
 - в) *Serratia marcescens*;
 - г) *Claviceps purpurea*.
12. Основою сироваріння є:
- а) ферментація;
 - б) коагуляція казеїну;
 - в) видовий склад мікрофлори;
 - г) високий вміст молочної кислоти.
13. Смакові властивості йогурту обумовлюють:
- а) оцтова й молочна кислоти;
 - б) казеїн і глікоген;
 - в) молочна кислота й ацетальдегід;
 - г) молочна кислота.
14. Заквасками для виготовлення молочнокислих продуктів є:
- а) симбіотичні комплекси молочнокислих дріжджів;
 - б) симбіотичні комплекси молочнокислих бактерій і дріжджів;
 - в) молочна кислота й ацетальдегід;
 - г) молочна кислота.
15. Речовини, які вносять до молочних продуктів для зміцнення структури та надання стійкості під час зберігання:
- а) пробіотики;
 - б) оцтова кислота;
 - в) стабілізатори;
 - г) молочна кислота.
16. Білково-вітамінними концентратами є:
- а) премікси;
 - б) кормові препарати з мікробної біомаси;
 - в) пробіотики;
 - г) молочнокислі продукти.
17. Ензиматично активною біомасою є:
- а) пребіотики;
 - б) молочнокислі продукти;
 - в) пробіотики;
 - г) хлібопекарські пресовані дріжджі.
18. Комплекс із фізіологічно активних речовин, – це:
- а) пребіотики;
 - б) премікси;
 - в) пробіотики;
 - г) молочнокислі продукти.
19. Лікувальні препарати, які містять складники нормальної мікрофлори людини, – це:
- а) пребіотики;

- б) премікси;
 - в) пробіотики;
 - г) молочнокислі продукти.
20. Біоспорин – це лікувальний препарат, який містить:
- а) *Lactobacillus acidophilus* і *Bifidobacterium longum*;
 - б) *Saccharomyces boulardii*;
 - в) *B. subtilis* і *B. licheniformis*;
 - г) *E. coli* і *Enterococcus faecalis*.

Завдання для самоконтролю

1. Виробництво хліба.
2. Виробництво вина, рому, коньяку, sake та ін. спиртових напоїв.
3. Виробництво хлібного квасу.
4. Виробництво кисломолочних продуктів: сирів (м'яких і твердих), масла, йогурту, ряжанки, кефіру, бринзи.
5. Способи квашення овочів.
6. Що таке білок одноклітинних та які мікроорганізми використовують для його отримання?
7. Як отримують мікробні препарати?
8. Традиційні білкові продукти, які отримують шляхом ферментації.
9. Використання ферментів у виготовленні фруктових соків.
10. Отримання та застосування харчових добавок.
11. Отримання та застосування харчових інгредієнтів: підкислювачів, вітамінів і пігментів, підсилювачів смаку, рослинних клеїв та згущувачів.
12. Способи запобігання мікробним пошкодженням продуктів харчування.
13. Що таке ензиматично активна біомаса? Як її отримують?
14. Отримання та використання преміксів, пробіотиків.
15. Види пробіотиків та їх вплив на здоров'я людини.

Література

1. Биотехнология. Принципы и применение : пер с англ. / под ред. Хиггинса И., Беста Д., Джонса Дж. – М. : Мир, 1988. – С. 14 – 15; 91 – 122.
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 441 – 465.
3. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 39 – 52.
4. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 301 – 302.
5. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : пер. с англ. / под ред. В.Г. Дебабова. – М. : Мир, 1987. – С. 242 – 254.
6. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 137 – 148.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 3

Мікробіологічний синтез амінокислот

Мета: ознайомитися з методами селекції продуцентів амінокислот і ферментів та біотехнологічними процесами отримання амінокислот та ферментів за участю мікроорганізмів.

План заняття

1. Характеристика методів селекції мутантів мікроорганізмів – надсинтетиків амінокислот.
2. Характеристика технологій отримання деяких амінокислот (глутамінової кислоти, лізину, триптофану) шляхом мікробіологічного синтезу.
3. Види комерційних ферментів, їхні продуценти, використання на практиці.
4. Характеристика технологій отримання деяких мікробних ферментів і ферментних препаратів (глюкозооксидази, амілаз, пектиназ та ін.).

Теоретичні відомості

У 60 – 70 рр. XX ст. швидкого розвитку набули такі галузі промислової мікробіології, як виробництво амінокислот, ферментів, вітамінів, гормонів та інших біологічно активних сполук, що синтезуються мікроорганізмами. Промислове виробництво цих цінних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів дало змогу охороні здоров'я, сільському господарству і харчовій промисловості використовувати їх у практичній діяльності. Амінокислоти застосовують як харчові добавки, приправи, підсилювачі смаку, сировину у парфумерній і фармацевтичній промисловостях, у виробництві інших речовин. Їх отримують як із природних продуктів (головно при гідролізі білків рослин), так і шляхом хімічного, мікробіологічного чи ферментативного синтезу.

Для виробництва амінокислот бактерії почали використовуватися з початку 50-х рр. XX ст. Штами постійно вдосконалювали генетичними методами, виділяючи ауксотрофні мутанти і мутанти зі зміненими регуляторними властивостями. Виробництво таких амінокислот, як L-глутамат, L-валін, DL-аланін, L-глутамін і L-пролін за участю диких штамів бактерій, базується на використанні властивих їм особливостей метаболізму чи на стимуляції утворення ними амінокислот у відповідь на зміну складу культурального середовища.

Продуцентами амінокислот є бактерії багатьох родів (наприклад, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherihia*), причому вони відрізняються високою продуктивністю, через що виробництво амінокислот стає рентабельним. Зокрема, види *Corynebacterium* чи *Brevibacterium*, які вирощують на карбонумісній сировині (гідролізатах

крохмалю, меласи із цукрової тростини і буряка), на етанолі чи ацетаті при наявності достатньої кількості біотину у середовищі здатні синтезувати до 30 г/л глутамату. Для накопичення цієї амінокислоти важливою умовою є повне або часткове пригнічення активності α -кетоглутаратдегідрогенази. Утворення продукту збільшується при внесенні β -лактамних антибіотиків (пеніциліну, цефалоспоринолу С), поверхнево-активних речовин і жирних кислот. Шляхом зміни умов культурального середовища процес ферментації, упродовж якого утворюється L-глутамат, може бути переключений на синтез L-глутаміну чи L-проліну.

Ауксотрофні мутанти не можуть утворювати інгібітори відповідного метаболічного шляху, які працюють за принципом зворотного негативного зв'язку, оскільки у них відсутня певна ключова ферментативна реакція. Тому при вирощуванні такого мутантного штаму на середовищі з мінімальною концентрацією потрібного поживного інгредієнта, вони здатні утворювати надлишкові кількості речовини-попередника чи близьких до неї метаболітів блокованої реакції. Зокрема, перші реакції у ланцюгу біосинтезу L-аргініну у *Corynebacterium glutamicum* інгібуються за механізмом зворотного зв'язку кінцевим продуктом, тобто утворення відповідних ферментів пригнічується L-аргініном. Ауксотрофні мутанти використовуються у тих випадках, коли потрібно синтезувати сполуки, що є кінцевими продуктами розгалужених ланцюгів метаболічних реакцій. Наприклад, L-аспартат є загальним попередником для L-лізину, L-треоніну, L-метіоніну та L-ізолейцину. Перша реакція у процесі утворення усіх цих амінокислот каталізується аспартаткіназою, активність якої може бути інгібована за механізмом зворотного зв'язку при сумісній дії L-лізину і L-треоніну.

Отримувати ауксотрофні мутанти, які здатні накопичувати продукти нерозгалужених ланцюгів біосинтезу, наприклад L-аргінін, неможливо. У таких випадках відбирають мутанти з частково порушеною регуляцією біосинтезу, що дає змогу отримувати підвищений вихід кінцевого продукту. Такі мутанти відомі як регуляторні; їх відбирають за стійкістю до аналогів амінокислот чи серед ревертантів ауксотрофів.

Практичні завдання

1. Зобразіть схематично технологічні схеми отримання деяких амінокислот (глутамінової кислоти, лізину, триптофану) шляхом мікробіологічного синтезу.
2. Заповніть таблицю, у якій зазначте найбільш використовувані види комерційних ферментів, їхні продуценти та використання на практиці.

Види комерційних ферментів	Продуцент ферменту	Використання на практиці

3. Зобразіть схематично технологічні схеми отримання таких ферментних препаратів, як глюкозооксидази, амілази та пектинази.

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Промисловими продуцентами *L*-лізину є організми роду:
 - а) *Clostridium*;
 - б) *Propionibacterium*;
 - в) *Corynebacterium*, *Brevibacterium*;
 - г) *Aspergillus*.
2. За ферментативного синтезу *L*-аспарагінової кислоти:
 - а) як вихідні речовини використовують фумарову кислоту й аміак;
 - б) іммобілізують клітини, які містять аспартазу;
 - в) як вихідні речовини використовують фумарову кислоту й рідкий азот;
 - г) іммобілізують фермент фумаразу.
3. Основними продуцентами вітаміну B_{12} є:
 - а) *Eremothecium aschbyii*, *Aschbii gossypii*;
 - б) *Aspergillus* і *Penicillium*;
 - в) *Candida famata*;
 - г) *Bacillus subtilis*;
 - д) *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* та *Pseudomonas denitrificans*.
4. Промисловими продуцентами вітаміну B_2 є:
 - а) *Eremothecium aschbyii*, *Aschbii gossypii*;
 - б) *Aspergillus* і *Penicillium*;
 - в) *Candida famata*, *Bacillus subtilis*;
 - г) *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*
 - д) *Pseudomonas denitrificans*.
5. Рибофлавін використовують для:
 - а) лікування захворювання крові (анемії);
 - б) лікування захворювань печінки і підшлункової залози;
 - в) для вітамінізації деяких сортів хліба;
 - г) додавання до складу кормів, префіксів;
 - в) у тваринництві як кормову добавку до раціону птахів і курей.
6. Для одержання ергостерину використовують мікроорганізми:
 - а) *Eremothecium aschbyii*, *Aschbii gossypii*;
 - б) *Aspergillus* і *Penicillium*;
 - в) *Candida famata*, *Bacillus subtilis*;
 - г) *Saccharomyces cerevisiae*, *S.carlbergensis*;
 - д) *Pseudomonas denitrificans*.
7. Вкажіть амілолітичний препарат з культури *Bacillus subtilis*:
 - а) амілоризин;
 - б) амілосубтилін;
 - в) протоклостридин.

8. Для очистки і виділення ферментів із культуральної рідини за умов глибинного культивування продуцента використовують методи:

- а) адсорбування;
- б) ультрафільтрування;
- в) центрифугування;
- г) фільтрування;
- д) сепарування.

9. Для розділення й очистки ферментів після концентрування фільтратів, центрифугатів і екстрактів використовують методи:

- а) вакуум-випарювання;
- б) ультрафільтрації;
- в) осадження органічними розчинниками;
- г) діалізу;
- д) адсорбції за допомогою гелів кальцій фосфату, алюміній гідроксиду й афінних сорбентів.

10. Вкажіть способи стабілізації ферментних препаратів:

- а) висушування;
- б) зберігання при низьких температурах, зміна рН, тиску;
- в) використання багатоатомних спиртів (гліцерину);
- г) використання вуглеводів і полісахаридів, йонів металів, детергентів чи інгібітрів;
- д) мікрокапсулювання і гранулювання.

Завдання для самоконтролю

1. Отримання мутантів мікроорганізмів із порушеною регуляцією синтезу метаболітів.
2. Основні принципи регуляції біосинтезу амінокислот у бактерій.
3. Механізми катаболітної репресії та координації біосинтезу амінокислот у бактерій.
4. Основні мішені у селекції надпродуцентів амінокислот.
5. Ауксотрофні мутанти у селекції надпродуцентів амінокислот.
6. Структурні аналоги у селекції надпродуцентів амінокислот.
7. Селекція надпродуцентів триптофану.
8. Селекція надпродуцентів лізину.
9. Селекція надпродуцентів глютаміну.
10. Мікробіологічні промислові процеси отримання амінокислот.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – 364 с.
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка – К. : Інкос, 2006. – С. 401 – 421.

3. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. Хиггинса И., Беста Д., Джонса Дж. – М. : Мир, 1988. – С. 122 – 123, 216 – 235.
4. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 53 – 65.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 209 – 210; 255 – 256.
6. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : пер. с англ. / А. Сассон / под ред. Дебабова В.Г. – М. : Мир, 1987. – С. 199 – 208.
7. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 55 – 80.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 4

Біотехнологія полісахаридів та ліпідів

Мета: ознайомитися з мікробними продуцентами полісахаридів та ліпідів, їх селекцією, біотехнологічними процесами отримання полісахаридів та ліпідів і використанням на практиці.

План заняття

1. Видова різноманітність продуцентів мікробних полісахаридів та їх використання на практиці.
2. Характеристика технології отримання мікробних полісахаридів (декстранів, альгінатів, полігідроксibuтиратів).
3. Видова різноманітність продуцентів ліпідів, особливості їх культивування.
4. Характеристика технології отримання деяких ліпідів.
5. Використання полісахаридів та ліпідів у виробництві, медицині.

Теоретичні відомості

Біополімери – це високомолекулярні речовини (нуклеїнові кислоти, полісахариди, ліпіди), що синтезуються різними організмами. Деякі з них мають цінні фізичні і хімічні властивості, через що використовуються у різних галузях народного господарства. Наприклад, полісахаридні гідроколоїди часто застосовуються у харчовій, парфумерно-косметичній, нафтовій, паперовій і тестильній промисловостях. Із червоних водоростей отримують у промислових масштабах каррагенан і агар, а з бурих – альгінати. Проте отримання полісахаридів із рослин має низку недоліків, тому більш перспективними об'єктами постають мікроорганізми. При отриманні полісахаридів із мікроорганізмів забезпечується контрольований синтез полімерів і постійність продукції. Крім того, мікробні полісахариди часто мають унікальні фізичні і хімічні властивості; поліпшені функціональні характеристики; біологічна потреба в кисні при їх утворенні невелика.

Мікроорганізми синтезують багато полісахаридів у формі позаклітинних капсул і слизу, не зв'язаних із клітинною стінкою. Наприклад, *Xanthomonas campestris* синтезує ксантан – перший мікробний полісахарид, який почали отримувати у промислових масштабах із 1967 р.; різними грампозитивними і грамнегативними бактеріями, такими як *Aerobacter spp.*, *Streptococcus bovis* і *S. viridans*, а також *Leuconostoc mesenteroides* синтезується декстран (α -D-глюкан); близькі до альгінату гетерополісахариди утворюють *Pseudomonas aeruginosa* і *Azotobacter vinelandii*; методом аеробної ферментації за участі *Pseudomonas elodea* отримують полісахарид геллан; із *Erwinia tahitica* – полісахарид занфлю; при вирощуванні гриба *Sclerotium glaucum* у глибинній культурі на

середовищі з кукурудзяним екстрактом – полісахарид політран (лінійний β -1,3-глюкан); кілька полісахаридів отримують за участі різних видів *Alcaligenes*: курдлан (α -1,3-глюкан) синтезується *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, пуллан (α -D-глюкановий полісахарид) синтезується *Aureobaculum pullulans*.

Із виникненням технології рекомбінантних ДНК з'явилася можливість створювати нові біополімери, замінювати синтетичні продукти їхніми біологічними аналогами, модифікувати вже існуючі біополімери з метою поліпшення їхніх фізичних і структурних характеристик, збільшувати ефективність відповідними промисловими процесами, зменшувати ціну.

Ліпіди – різноманітні за структурою та фізико-хімічними властивостями природні речовини. Вивчення ліпідів мікроорганізмів бере початок із 1978 р., коли німецькі дослідники помітили утворення крапель жиру у дріжджів, що росли за умов надлишку кисню. За вмістом ліпідів у клітинах мікроорганізмів-продуцентів їх розміщують у такій послідовності: дріжджі *Cryptococcus terricolus* → *Lipomyces* → *Rhodotorula* → *Sporobolomyces* → *Trichosporon*; бактерії *Alcaligenes* → *Actinomyces* → *Mycobacterium* → *Pseudomonas* тощо. Здатність продукувати ліпіди залежить від умов культивування, зокрема від співвідношення сполук Нітрогену й Карбону в середовищі. У промислових масштабах виробництво ліпідів за допомогою мікроорганізмів не налагоджено, хоча потенційних продуцентів відомо багато. Налагоджено виробництво мікробних ліпідів – побічного продукту при одержанні білково-вітамінних препаратів на вуглеводнях нафти. При цьому отримують мікробний жир і кормовий білковий концентрат.

Отримані ліпіди використовують у текстильній, керамічній, шкіряній, металообробній промисловостях; при виробництві каучуку, гуми, фармацевтичних препаратів, косметики, мила, оліф, у процесі флотації руд та ін.; для кормів тварин і птахів.

Практичні завдання

1. Заповніть таблицю, вказавши продуценти мікробних полісахаридів, його назву та використання на практиці.

Продуцент полісахариду	Назва полісахариду	Використання на практиці

2. Зобразіть схематично технологічні етапи отримання декстрану, альгінату та полігідроксibuтирату.

3. Заповніть таблицю, вказавши продуценти ліпідів та особливості їх культивування.

Продуцент ліпиду	Назва ліпиду	Умови культивування продуцента

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Декстрини здатні синтезувати:

- а) *Streptococcus* і *Lactobacillus*;
- б) *Streptomyces* і *Micrococcus*.
- в) *Cephalosporin*;
- г) *Penicillium* і *Aspergillus*.

2. Виберіть мікроорганізми, що здатні синтезувати кілька різних гліканів:

- а) *Leuconostoc mesenteroides* і *Serratia marcescens*;
- б) *Streptomyces aureofaciens* і *Streptococcus pyogenes*;
- в) *Penicillium chrysogenum* і *P.notatum*;
- г) *Escherichia coli*, *Sarcina flava*.

3. Із якого полісахариду виготовляють препарат – замінник плазми крові:

- а) ксантану;
- б) зимозану;
- в) декстранів;
- г) пулулану;
- д) занфло?

4. Для яких екzogліканів налагоджено промислове виробництво:

- а) декстрану, ксантану, пулулану, курдлану;
- б) склероглюону, занфло;
- в) декстрану, ксантану, продигіозану;
- г) зимозану, курдлану, левану?

5. Яке фізіологічне значення для мікроорганізмів має продукування полісахаридів:

- а) зберігання клітин від висушування;
- б) захист клітин від дії УФО і різних хімічних агентів;
- в) захист від бактеріофагів;
- г) резервне джерело Карбону й енергії або Нітрогену.

6. У яких галузях господарства використовують мікробні ліпіди:

- а) текстильній, керамічній, шкіряній, металообробній промисловостях;
- б) при виробництві каучуку, гуми;
- в) при виробництві фармацевтичних препаратів, косметики, мила, оліф;
- г) у процесі флотації руд;
- д) як корм для тварин і птахів.

7. Виберіть вимоги до мікроорганізмів – продуцентів ліпідів:

- а) швидко рости на різних субстратах із високим виходом біомаси;
- б) рости в умовах глибинного культивування;
- в) нагромаджувати значну кількість ліпідів за відношенням до сухих речовин клітини;
- г) здійснювати біосинтез у звичайних умовах.

8. Виберіть продуценти ліпідів:

- а) *Cryptococcus*, *Lypomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*;
- б) *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Micrococcus*;

в) *Sarcina*, *Micrococcus*, *Aspergillus*;

г) *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*.

9. Під час виробництва ліпідів отримують два продукти:

а) мікробний жир і знежирений білковий препарат;

б) білково-вітамінний препарат і гліцерин;

в) прості та складні ліпіди.

10. Склад ліпідів, що утворюються мікроорганізмами, залежить від:

а) джерела Карбону, рН, температури;

б) мінеральних сполук середовища;

в) джерела Нітрогену, органічних сполук;

г) наявності вітаміну С.

Завдання для самоконтролю

1. Мікробіологічний синтез тваринного полімеру з адгезивними властивостями.

2. Мікробіологічний синтез каучуку.

3. Мікробіологічний синтез полігідроксилалканоатів.

4. Біологічне значення полісахаридів.

5. Види позаклітинних мікробних полісахаридів.

6. Технологія отримання зимозану.

7. Технологія отримання ксантану.

8. Конструювання рекомбінантної бактерії *Xanthomonas campestris* із метою отримання ксантової слизи.

9. Види промислових продуцентів ліпідів.

10. Які середовища використовують для продукування мікробами мікробного жиру?

Література

1. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. Хиггинса И., Беста Д., Джонса Дж. – М. : Мир, 1988. – С. 122 – 123, 216 – 235.
2. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 81 – 88.
3. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 266 – 272.
4. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : пер. с англ. / А. Сассон / под ред. Дебабова В.Г. – М. : Мир, 1987. – С. 223 – 224.
5. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 72 – 79.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5

Біотехнологія антибіотиків

Мета: ознайомитися з конструюванням та селекцією продуцентів антибіотиків, а також із біотехнологічними процесами їх отримання.

План заняття

1. Характеристика методів конструювання та селекції деяких продуцентів антибіотиків: пеніциліну, стрептоміцину.
2. Продуценти антибіотиків, їх біологічна дія на організми.
3. Характеристика технології отримання пеніциліну.
4. Характеристика промислового виробництва деяких антибіотиків немедичного призначення: субтиліну, нізину.

Теоретичні відомості

Початок бурхливого розвитку мікробіологічної промисловості пов'язаний із розробкою у 40-х роках ХХ ст. промислового отримання пеніциліну. Успішне використання цього цінного антибіотика у медичній практиці спонукало до пошуку нових антибіотичних речовин і розробки більш досконалих методів їх промислового отримання. Сьогодні більше сотні антибіотиків, призначених для медицини, сільського господарства, харчової промисловості, освоєні мікробіологічною промисловістю і випускаються у необхідних кількостях. Слід зазначити, що великого розмаху отримав останніми роками випуск хімічно модифікованих антибіотичних засобів.

Антибіотики – найбільший клас фармацевтичних сполук, синтез яких здійснюється мікробними клітинами. До цього класу належать антигрибкові агенти, протипухлинні ліки та алкалоїди. Щорічно у всьому світі виробляється 100 000 т антибіотиків на суму близько 5 млрд доларів, у тому числі більше 100 млн доларів віділено на антибіотики, що додаються до корму тварин як добавки чи прискорювачі росту. Шість родів філаментозних грибів синтезують близько 1000 антибіотиків, у тому числі цефалоспорини (*Cephalosporium*) і пеніциліни (*Penicillium*). Два роди нефіламентозних бактерій синтезують 500 антибіотиків, а три роди актиноміцетів – близько 3000 антибіотиків.

Серед актиноміцетів найбільшим продуцентом антибіотиків є рід *Streptomyces*, включаючи тетрацикліни (один тільки вид *Streptomyces griseus* синтезує більше 50 антибіотиків).

За останніми даними, щороку вчені виявляють від 100 до 200 нових антибіотиків, насамперед у рамках великих дослідницьких програм із пошуку серед тисячі різних мікроорганізмів таких, які синтезували б унікальні антибіотики. Отримання і клінічне дослідження нових препаратів дуже дорогі,

а у продаж надходять тільки ті, що становлять найбільшу терапевтичну цінність і економічний інтерес.

Основою промислового виробництва антибіотиків є ціла низка послідовних етапів: отримання високопродуктивних штамів-продуцентів, розробка найоптимальніших умов культивування продуцента антибіотика з максимальним біосинтезом цільового продукту, добір і введення у практику відповідних методів виділення й очистки антибіотика, створення готових препаратів та контроль їх якості. Кожен із цих етапів необхідно забезпечити відповідними спеціалістами (генетиками, мікробіологами, технологами та ін.).

Практичні завдання

1. Заповніть таблицю, вказавши методи конструювання та селекції деяких продуцентів антибіотиків.

Метод селекції	Характеристика методу селекції

2. Заповніть таблицю, вказавши види антибіотиків, їх продуценти та біологічну дію.

Види антибіотиків		Продуценти	Біологічна дія антибіотиків
Клас хімічних сполук	Назва антибіотика		

3. Зобразіть схематично технологію отримання пеніциліну.

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Антибіотики:

- а) вперше описав Ваксман у 1942 р.;
- б) пригнічують ріст бактерій і вірусів;
- в) синтезуються лише грибами;
- г) у промисловості одержують шляхом мікробіологічного і хімічного синтезу.

2. Яку фізіологічну роль мають антибіотики для їх продуцентів:

- а) пригнічують функцію 50 S-рибосом;
- б) викликають мікробіцидний або мікробостатичний ефект;
- в) забезпечують виживання продуцентів за умов конкуренції;
- г) є основою клітинного імунітету.

3. Продуцентами β -лактамних антибіотиків є:

- а) *Streptomyces erythreus*;
- б) *Streptomyces aureofaciens*;

- в) *Penicillium chrysogenum*, *P. notatum*, *Cephalosporium* sp.;
- г) *Streptomyces griseus*.
- 4.** Продуцентом макролідного антибіотика еритроміцину є:
- а) *Streptomyces erythreus*;
- б) *Streptomyces aureofaciens*;
- в) *Penicillium chrysogenum*, *P. notatum*;
- г) *Cephalosporium* sp.
- 5.** Продуценти аміноглікозидних антибіотиків стрептоміцину і неоміцину:
- а) *Streptomyces erythreus*;
- б) *Streptomyces aureofaciens*;
- в) *Penicillium chrysogenum*;
- г) *Cephalosporium* sp.;
- д) *Streptomyces griseus*;
- е) *Streptomyces fradiae*.
- 6.** Продуцентами тетрациклінів є:
- а) *Streptomyces erythreus*;
- б) *Streptomyces aureofaciens*;
- в) *Penicillium chrysogenum*;
- г) *Penicillium notatum*;
- д) *Streptomyces griseus*;
- е) *Streptomyces fradiae*.
- 7.** Продуцентами поліпептидних антибіотиків поліміксинів і бацитрацинів є:
- а) *Streptomyces aureofaciens*;
- б) *Bacillus polymyxa*;
- в) *Bacillus licheniformis*;
- г) *Bacillus thuringiensis*;
- д) *Penicillium notatum*;
- е) *Penicillium chrysogenum*.
- 8.** Які антибіотики використовують як кормові:
- а) теравіт, біовіт, бацитрацин;
- б) гризин, гігromіцин Б;
- в) стрептоміцин, пеніцилін;
- г) грізофульвін, трихотецин;
- д) касугаміцин, поліоксини, валідаміцин;
- е) тетранастин, гербіцидини, тойокаміцин?
- 9.** Які антибіотики використовують проти фітопатогенних мікроорганізмів:
- а) теравіт, біовіт, бацитрацин, гризин, гігromіцин Б;
- б) грізофульвін, нізин;
- в) стрептоміцин, пеніцилін;
- г) грізофульвін, трихотецин, касугаміцин;
- д) поліоксини, валідаміцин, тетранастин;
- е) гербіцидини, тойокаміцин?
- 10.** Які антибіотики використовують у харчовій і консервній промисловості:
- а) теравіт, біовіт, бацитрацин;
- б) грізофульвін, трихотецин;

- в) субтилін, нізін;
- г) поліоксини, касугаміцин, валідаміцин;
- д) тетранастин, гербіцидини, тойокаміцин;
- е) гризин, гігроміцин Б?

Завдання для самоконтролю

1. Антибіотики, які синтезуються бактеріями.
2. Антибіотики, які синтезуються актиноміцетами.
3. Антибіотики, які синтезуються міцеліальними грибами.
4. Виділення й очистка антибіотиків.
5. Біологічний і фармакологічний контроль препаратів антибіотиків.
6. Напівсинтетичні антибіотики.
7. Використання антибіотиків у сільському господарстві.
8. Використання антибіотиків у харчовій промисловості.
9. Технологічні основи виробництва антибіотиків.
10. Методи отримання рекомбінантних антибіотиків.

Література

1. Биотехнология. Принципы и применение : пер с англ. / под ред. Хиггинса И., Беста Д., Джонса Дж. – М. : Мир, 1988. – С. 155 – 164, 326, 358.
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін./ за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 396 – 307.
3. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 89 – 95.
4. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 257 – 265.
5. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : пер. с англ. / А. Сассон / под ред. Дебабова В.Г. – М. : Мир, 1987. – С. 209 – 216.
6. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 96 – 111.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 6

Біотехнологія бактерійних добрив, засобів захисту рослин, мікробної біомаси

Мета: ознайомитися з біотехнологічними процесами отримання бактерійних добрив, засобів захисту рослин, їх продуцентами, а також з технологією отримання мікробної біомаси.

План заняття

1. Характеристика типів бактерійних добрив і їх мікробних продуцентів.
2. Технологічні етапи отримання мікробних препаратів нітрагіну, азотобактерину та боверину.
3. Характеристика технології отримання ентомогенних препаратів та засобів захисту рослин: токсинів *Bacillus thuringiensis*, віринів, фітобактеріоміцинів, трихотецину й ін.
4. Технологія отримання ензиматично активної біомаси дріжджів.
5. Види преміксів та їх застосування.
6. Види пробіотиків та технологія їх отримання.

Теоретичні відомості

Розвиток нового напрямку прикладних досліджень із пошуку новітніх засобів захисту рослин зумовлений багатьма вадами пестицидів та інших засобів захисту рослин. У ситуації, що склалась у сільському господарстві, одним із виходів вбачають заміну пестицидів на мікробні препарати (бактерії, актиноміцети, гриби), живі організми (хижаки і паразити шкідників та збудників хворіб) або продукти їхньої життєдіяльності. Незважаючи на численні розробки біопрепаратів із захисту рослин від хворіб, поки що лише деякі з них рекомендовані для використання. Проводяться пошуки й антивірусних антибіотиків. У деяких країнах дозволено використовувати антибіотики медичного призначення або синтезовані для захисту рослин у “чистому вигляді” або в суміші з фунгіцидами. Деякі зарубіжні фірми вже випускають препарати антибіотиків спеціально для захисту рослин: бластоцидин, касугиміцин, поліоксин, валідаміцин та ін. У нашій країні найбільш поширеними антибіотиками є трихотецин, фітобактеріоміцин і фітолавін-100. Вважається, що застосування антибіотиків для захисту рослин від хворіб не має перспективи, оскільки вони не виявляють високоспецифічної дії та вибіркості щодо конкретного патогену, завдаючи при цьому шкоди рослинам, тваринам і корисним мікроорганізмам ґрунтів. Задля уникнення негативних наслідків застосування антибіотиків були зроблені спроби використовувати антагоністичні властивості мікроорганізмів. Антагонізм, характерний для більшості організмів, особливо сильно проявляється серед ґрунтових мікроорганізмів, де мікрофлора дуже різноманітна і густота мікробного населення дуже висока. За останні 40 років дослідниками-

мікробіологами проведена величезна робота з виявлення антагоністів, вивчення їхньої біології, взаємовідносин із патогенами та іншими мікроорганізмами (до рослин і тварин). У результаті багаторічної роботи серед грибів, бактерій і більшості актиноміцетів виявлені антагоністи практично до всіх патогенних грибів, бактерій, актиноміцетів і навіть мікоплазм. Знайдені віруси фітопатогенних бактерій і актиноміцетів, виявлені паразити паразитів на різних рівнях організації живого. Таким чином, створений арсенал для розвитку класичного методу біологічного захисту рослин, який передбачає використання живих організмів для контролю кількості небажаних (у тому числі патогенних) організмів в агроценозах.

Практичні завдання

1. Заповніть таблицю, у якій зазначте види бактерійних добрив, їх мікробний склад та застосування на практиці.

Види бактерійних добрив	Мікроорганізми – складники бактерійних добрив	Галузі застосування бактерійних добрив

2. Зобразіть схематично технологію отримання мікробних препаратів нітрагіну.

3. Зобразіть схематично технологію отримання ентомогенного препарату-токсину на основі *Bacillus thuringiensis*.

4. Заповніть таблицю, у якій зазначте види, склад та застосування пробіотиків.

Види пробіотиків	Мікроорганізми – складники пробіотиків	Застосування пробіотиків

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Продуцентами ентомопатогенних препаратів є:

- а) бактерії, гриби, віруси;
- б) віруси, рослини;
- в) бактерії, рослини;
- г) бактерії, тваринні клітини.

2. На основі яких мікроорганізмів отримано препарати ентеробактерин, інсектин, дендробацилін, біоспор:

- а) фітопатогенних вірусів;
- б) *Bacillus polymyxa*;
- в) *Bacillus licheniformis*;

г) *Bacillus thuringiensis*;

д) *Beauveria bassiana*?

3. *Beauveria bassiana* використовують для виготовлення препаратів:

а) боверину та біотрону;

б) ентеробактерину;

в) інсектину, дендробациліну;

г) біоспору.

4. На основі яких мікроорганізмів отримано препарати вірини:

а) фітопатогенних вірусів;

б) *Bacillus polytuxa*;

в) *Bacillus licheniformis*;

г) *Bacillus thuringiensis*;

д) *Beauveria bassiana*?

5. Які препарати бактерійних добрив виготовляють на основі бактерій роду *Rhizobium*:

а) азотобактерин;

б) фосфобактерин;

в) ризобін;

г) нітрагін?

6. Які мікроорганізми використовують для одержання стимуляторів росту рослин (гіберелінів):

а) *Azotobacter chroococcum*;

б) *Fusarium moniliforme*;

в) *Bacillus megaterim*;

г) *Bacillus thuringiensis*;

д) *Beauveria bassiana*.

7. Основним недоліком мікробної біомаси як харчової сировини є:

а) високий уміст білка;

б) низький уміст білка;

в) високий уміст нуклеїнових кислот;

г) низький уміст нуклеїнових кислот;

д) високий уміст ліпідів;

е) низький уміст ліпідів.

8. Які мікроорганізми використовують для отримання пробіотиків:

а) молочнокислі бактерії та дріжджі;

в) молочнокислі стрептококи й ентерококи;

г) біфідобактерії та молочнокислі бактерії, зокрема лактобацили;

д) молочнокислі бактерії й оцтовокислі бактерії?

9. Вкажіть назву кормового препарату з мікробної біомаси, багатого на вітаміни групи В:

а) препарат вітамінів;

в) премікси;

г) білково-вітамінний препарат;

д) пробіотики.

10. Вкажіть основну функцію пробіотиків:

- а) захисна – на шляху проникнення патогенної мікрофлори;
- в) стабілізаційна – регулювання нормального мікробіоценозу кишківника;
- г) детоксикаційна – виведення токсичних продуктів обміну з кишківника.

Завдання для самоконтролю

1. Умови вирощування і збереження бульбочкових бактерій.
2. Інокуляція та збереження препаратів бульбочкових бактерій.
3. Мікробні препарати проти комах – шкідників рослин.
4. Вірусні препарати проти комах – шкідників рослин.
5. Мікробні препарати проти гризунів – шкідників рослин.
6. Мікробіологічні засоби проти захворювань рослин.
7. Використання ензиматично активної біомаси дріжджів.
8. Застосування мікробної маси для очистки стічних вод.
9. Охарактеризуйте складові преміксів.
10. Види мікроорганізмів, що використовуються у складі пробіотиків.

Література

1. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. Хиггинса И., Беста Д., Джонса Дж. – М. : Мир, 1988. – С. 155 – 164, 326, 358.
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 566 – 585.
3. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 177 – 196.
4. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 331 – 343.
5. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : пер. с англ. / А. Сассон / под ред. Дебабова В.Г. – М. : Мир, 1987. – С. 209 – 216.
6. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 137 – 156.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 7

Інженерна ензимологія

Мета: ознайомитися з промисловими процесами інженерної ензимології, видами іммобілізації ферментів і клітин, видами біосенсорів та їх застосуванням.

План заняття

1. Способи іммобілізації ферментів.
2. Основні промислові процеси за використання іммобілізованих ферментів.
3. Способи іммобілізації клітин.
4. Основні промислові процеси за використання іммобілізованих клітин.
5. Характеристика основних типів біосенсорів та принципи їх функціонування.

Теоретичні відомості

Інженерна ензимологія – галузь біотехнології, котра займається опрацюванням технологічних процесів, які ґрунтуються на каталітичній дії ферментів (ізольованих або таких, що містяться у клітині, штучно позбавленій здатності рости та розмножуватися).

Ферменти є високоактивними і нетоксичними біокаталізаторами, які широко застосовують у харчовій промисловості, медицині, для очищення середовища від пластмас, пестицидів, деяких отруйних сполук тощо. Останнім часом ферменти інтенсивно використовують в органічному синтезі L-амінокислот. Практичне застосування мають целюлаза, кератиназа, таназа, рацемази тощо. Значний інтерес становлять ферменти, виділені з термофільних мікроорганізмів, які здійснюють каталіз при температурі більше +80°C.

Джерелом отримання деяких ферментів є рослини (протеїнази) і тканини тварин (хімотрипсин, амілаза, колагеназа, ліпаза). Однак основним їх джерелом є мікроорганізми. Це обумовлено високою інтенсивністю мікробного метаболізму, швидким приростом біомаси на дешевих (нехарчових) субстратах тощо. В інженерній ензимології використовують як дикі, так і мутантні штами мікроорганізмів.

Крім високоочищених ферментів, промисловість випускає ферментні препарати, що містять кілька складників. Ферментні препарати класифікують за основним компонентом (ферментом): амілолітичні містять амілази, протеолітичні – протеази, ліполітичні – ліпази і т.д.

Процес виробництва ферментів і ферментних препаратів включає три стадії: отримання посівного матеріалу; отримання виробничої культури з використанням методів поверхневого і/або глибинного культивування; отримання з готової виробничої культури технічних чи очищених ферментних препаратів і ферментів.

На виробництві, де продуцентами ферментів чи ферментних препаратів є гриби, використовують частіше поверхневий спосіб культивування. Глибинне культивування, яке має низку переваг порівняно з поверхневим, проводять у ферментерах. Залежно від способу глибинного культивування розрізняють три групи ферментерів:

- 1) комбіновані з механічним перемішуванням і автоматичною аерацією;
- 2) інжекційні (автоматичне перемішування й аерація різними способами);
- 3) барботажні (перемішування за допомогою аерації).

Основою сучасної інженерної ензимології є застосування іммобілізованих ферментів, ферментних систем або клітин. **Іммобілізація** – фіксація низькомолекулярних лігандів, макромолекул, клітинних органел або клітин на певному носії (матриці).

Іммобілізовані ферменти – препарати ферментів, молекули яких зв'язані з матрицею, або носієм (як правило, полімером), та зберігають при цьому (повністю або частково) свої каталітичні властивості.

Методи іммобілізації ферментів поділяються на фізичні (адсорбція, включення в гель, включення в ліпосоми та інкапсулювання) та хімічні (ковалентне зв'язування). Іммобілізація надає ферментам властивості гетерогенних каталізаторів, тому їх можна видалити з реакційної суміші (відокремити від субстратів і продуктів ферментативних реакцій) простою фільтрацією.

Основні промислові процеси з використанням іммобілізованих ферментів передбачають отримання глюкозо-фруктозних сиропів, синтез L-аспарагінової кислоти з фумарової кислоти та ін.

Альтернативою іммобілізації ферментам є іммобілізація клітин – продуцентів цих ферментів. Іммобілізовані мікробні клітини – клітини мікроорганізмів, зафіксовані на твердих носіях або включені до матриці за допомогою адсорбції (з використанням активованого вугілля, оксиду алюмінію, силікагелю, поліуретанів та ін.) або механічних включень у гелі (які отримані полімеризацією ненасичених мономерів чи поліконденсацією і здатні до просторової структуризації, або отримані на основі неструктурованих природних і синтетичних полімерів) та хімічних методів (наприклад, приєднання чи зв'язування клітин до поверхні зерен сефадексу за допомогою глутарового альдегіду) тощо. Іммобілізація нативних мікробних клітин розширює шляхи використання мікроорганізмів і вироблених ними біокаталізаторів (ферментів) у різних технологічних процесах унаслідок суттєвого подовження роботи біокаталізаторів у стандартних умовах. Іммобілізовані клітини використовуються для створення іммобілізованих ферментних препаратів для медицини та різних галузей народного господарства: α -амілази, бромелаїну, папаїну, пероксидази, трипсину, уреаз, стрептокінази та ін.

Основні промислові процеси з використанням іммобілізованих клітин передбачають отримання глюкозо-фруктозних сиропів із сахарози (на основі ферменту інвертази) та інші важливі процеси.

Імобілізація ферментів і клітин стала основою для конструювання аналітичних приладів нового покоління – біосенсорів.

Біосенсор – це аналітичний прилад, у якому для визначення хімічних сполук використовуються реакції цих сполук, що каталізуються ферментами.

Згідно з класифікацією IUPAC, біосенсор – це автономний інтегральний аналітичний прилад, який забезпечує кількісний чи напівкількісний аналіз, із використанням біологічного розпізнавального елемента, що перебуває у прямому контакті з фізичним перетворювачем.

Біосенсор перетворює зміну фізико-хімічних характеристик біоматриці на електричний чи оптичний сигнали з амплітудою, яка залежить від концентрації певної речовини у розчині.

Біосенсиори складаються з трьох частин: біоселективного елемента, перетворювача та електроніки.

Біоселективними елементами можуть бути інтактні органи, кусочки тканин, мікроорганізми, органели, природні біомембрани або ліпосоми, рецептори, ферменти, антитіла й антигени, нуклеїнові кислоти та інші біомолекули, а також біоміметики, які імітують структурно-функціональні особливості природного біоелемента.

Запропоновано кілька основних типів біосенсорів, які відрізняються за характером перетворювача: амперометричні, потенціометричні (як правило, на основі рН-залежних польових транзисторів), кондуктометричні, термісторні та оптичні. Перші три типи мають спільну електрохімічну природу й об'єднуються під спільним терміном “електрохімічні біосенсиори”. Основна принципова відмінність між ними полягає у природі вимірюваного електрохімічного сигналу: сили струму (амперометричні), різниці потенціалу (потенціометричні), електричної провідності (кондуктометричні). При використанні термісторних перетворювачів вимірюється зміна температури завдяки тепловому ефекту аналітичної реакції, а в оптичних – інтенсивність генерованої світлової енергії.

Важливими перевагами біосенсорів є хімічна селективність (особливо за взаємодій “антиген – антитіло”, коли константа зв'язування сягає величин 10^4 – 10^{12} M^{-1}) і висока чутливість, можливість мініатюризації та сумісність із комп'ютерними процесорами; недоліками – обмежена стабільність та складність у приготуванні біоелемента.

Найбільш поширені і вже знайшли комерційне використання ферментні біосенсиори. Інтенсивні наукові розробки присвячені також клітинним сенсорам, передовсім мікробного типу. Ензимні сенсори відзначаються високою селективністю і швидкодією завдяки високій активності та можливості створення високої локальної концентрації фермента в чутливому шарі. Проте недоліком багатьох ферментних сенсорів є нестабільність та висока вартість ферментів. Клітинні, особливо мікробні, біосенсиори мають низку серйозних переваг порівняно з їх ензимними аналогами – доступність, низька ціна і простота отримання біоелементів, можливість використання довгих метаболічних ланцюжків, відсутність потреби у виділенні очищених ферментів та використанні екзогенних кофакторів, можливість метаболічного

конструювання на генетичному і біохімічному рівнях, широкий спектр у виборі трансдуктора, інтегральність клітинної відповіді (це важливо при тестуванні сумарної токсичної та мутагенної дії компонентів довкілля), можливість у деяких випадках зберігати життєздатність сенсорних клітин і навіть забезпечити їх розмноження, вища стабільність, ніж у ензимних елементів. Основним недоліком мікробних біосенсорів є повільність розвитку сигналу через нижчу концентрацію залучених у клітинну відповідь ферментів та низька селективність сенсорної відповіді, особливо у випадку мікробних O_2 -електродних сенсорів у зв'язку з широкою субстратною специфічністю процесів клітинного дихання, проте завдяки прогресу генної інженерії і можливості забезпечення високого рівня внутрішньоклітинної експресії цільового аналітичного фермента ці дві основні вади мікробних сенсорів не є нездоланими.

Найвідоміший приклад комерційного біосенсора – це амперометричний біосенсор для вимірювання рівня глюкози в крові, в якому використовується фермент глюкозооксидаза. Сьогодні активно ведуться дослідження стосовно конструювання ефективних біосенсорів для потреб промисловості, біотехнології, медицини.

Практичні завдання

1. Заповніть таблицю, у якій зазначте промислові процеси за використання іммобілізованих ферментів.

Назва процесу	Методика проведення	Фермент	Значення

2. Заповніть таблицю, у якій зазначте промислові процеси за використання іммобілізованих клітин.

Назва процесу	Методика проведення	Клітини	Значення

3. Заповніть таблицю, у якій зазначте тип біосенсора та принцип його функціонування.

Тип біосенсора	Принцип його функціонування

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Носіями іммобілізованих ферментів на основі органічних сполук синтетичних полімерів є:

- а) силікагель, поліуретан, міозин;
- б) поліефір, алюмосилікат, глина;
- в) полістирол, поліамід, поліефір;
- г) сіркопористе скло, поліамід, агароза.

2. Вкажіть гідролітичні ферменти, які найчастіше використовують для іммобілізації:

- а) силікагель, поліуретан, міозин;
- б) поліефір, алюмосилікат, глина;
- в) целюлаза, декстран, гепарин;
- г) ренін, каталаза, трипсин.

3. Назвіть основні способи іммобілізації ферментів :

- а) адгезія, ковалентні зв'язки між ферментом і носієм, адсорбція;
- б) адсорбція, інкапсулювання, полімеризація;
- в) зшивання молекул ферменту, сополімеризація, мінералізація;
- г) когезія, гібридизація, адсорбція.

4. Глюкозо-фруктозний сироп отримують за використання ферменту:

- а) глюкозоізомерази;
- б) пеніцилази;
- в) лактози;
- г) аспартази.

5. Включення клітин у гель відбувається за допомогою:

- а) лактату;
- б) кальцій альгілату;
- в) хлорид натрію;
- г) агару.

6. Біотестування – це :

а) система оцінки якісного визначення біологічно-активних речовин з використанням біологічних систем;

б) виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей шляхом перенесення денатурованих молекул ДНК;

в) система оцінки якісного чи кількісного визначення біологічно-активних речовин з використанням біологічних систем;

г) система оцінки кількісного визначення біологічно-активних речовин із використанням біологічних систем.

7. Процес отримання глюкози з целюлози полягає у внесенні такого ферменту:

- а) інвертази;
- б) глюкоамілази;
- в) аспартази;
- г) целюлази.

8. Електрохімічні біосенсиори класифікують на:

- а) потенціометричні, хімічні, термічні;
- б) потенціометричні, амперометричні, кондуктометричні;
- в) кондуктометричні, механічні, оптичні;
- г) амперометричні, потенціометричні, електричні.

9. Розділення рацемічних сумішей амінокислот відбувається за допомогою ферменту:

- а) фумарази;
- б) аспартази;

- в) аміноацелази;
- г) ізомерази.

10. Імобілізовані клітини використовують у :

- а) виробництві метану, пива, сирів;
- б) виробництві ліків, молока, обробці шкірних виробів;
- в) виробництві антибіотиків, амінокислот та трансформації стероїдів;
- г) при проведенні різноманітних аналізів, обробці стічних вод.

Завдання для самоконтролю

1. Промислові продуценти ферментів.
2. Селекція і конструювання продуцентів ферментів.
3. Технологічні схеми отримання ферментів і ферментних препаратів.
4. Використання ферментів і ферментних препаратів у промисловості.
5. Методи імобілізації ферментів.
6. Використання ферментів і клітин у біотрансформації органічних сполук.
7. Опишіть будову біосенсорів.
8. Охарактеризуйте будову амперометричних біосенсорів.
9. Охарактеризуйте будову кондуктометричних біосенсорів.
10. Біосенсорика як галузь науки.
11. Використання імобілізованих клітин бактерій для трансформації стероїдів.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 274 – 302
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 178 – 295; 423 – 440.
3. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 96 – 121.
4. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 209 – 210; 255 – 256.
5. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : пер. с англ. / А. Сассон / под ред. Дебабова В.Г. – М. : Мир, 1987. – С. 199 – 208.
6. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 169 – 180.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 8

Генно-інженерні методи конструювання промислових штамів мікроорганізмів

Мета: ознайомитися з генно-інженерними методами селекції і конструювання промислових штамів мікроорганізмів.

План заняття

1. Характеристика генно-інженерних методів конструювання штамів мікроорганізмів:
 - індукований мутагенез та ступінчастий відбір;
 - метод злиття протопластів;
 - кон'югація і трансдукція;
 - векторна трансформація.
2. Характеристика деяких методів селекції штамів мікроорганізмів:
 - метод відбитків;
 - метод селективних середовищ;
 - метод фільтраційного збагачення.
3. Генна інженерія промислово важливих штамів мікроорганізмів: *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, дріжджів *Saccharomyces*.

Теоретичні відомості

Промислова мікробіологія базується на ферментації мікроорганізмів: міксоміцетів, дріжджів, бактерій – представників різних фізіологічних і таксономічних груп, що різняться як за типом метаболізму, так і за типом живлення. Незважаючи на розмаїття агентів, що здійснюють біотехнологічні маніпуляції, основними об'єктами біотехнології залишаються мікроорганізми. Останні, маючи широкий набір різних ферментів, здатні утворювати у процесі життєдіяльності різні продукти обміну, необхідні для практичної діяльності людини. У виробництві різних мікробних препаратів застосовують штами природні, змінені в результаті мутацій, і одержані методами генної та клітинної інженерії. Природні штами використовують здебільшого для виробництва біомаси, бактерійних добрив та біоінсектицидів. Природні штами, як правило, не нагромаджують надлишку будь-якого метаболіту, оскільки у них наявні високоефективні регуляторні механізми, що запобігають перевиробництву метаболітів. Тому у промислових виробництвах, де цільовим продуктом слугує не біомаса, а екзометаболіти, використовують генетично змінені штами.

Конструювання та селекцію промислових штамів мікроорганізмів здійснюють шляхом уведення мутацій у геном клітини методами “сліпого” мутагенезу, індукованого мутагенезу у поєднанні зі ступінчастим відбором, генетичною рекомбінацією, методами генної інженерії з подальшим відбором потрібних клонів.

Для введення мутацій у геном використовують фізичні (УФО, іонізуюче чи радіоактивне випромінювання) та хімічні (акридинові барвники, етилметан сульфонат, нітрозоетилсечовину, бромистий етидій тощо) мутагени. Результати мутацій можуть проявитися у різних змінах метаболізму клітини: підвищення рівня синтезу біосинтетичних ферментів чи їхньої активності (наприклад, мутанти з порушеною структурою білка-репресора чи алостеричною нечутливістю); блокування подальшого внутрішньоклітинного перетворення метаболіту; блокування деградації продукту; забезпечення ефективної експресії продукту з клітини; посилення позитивної регуляції синтезу продукту тощо.

Для введення мутацій у конкретний ген чи оперон використовують **метод індукованого мутагенезу**. Цим методом одержано більшість продуцентів антибіотиків, ферментів, органічних кислот, вітамінів, амінокислот та інших культур мікроорганізмів, що використовуються у мікробіологічній промисловості.

Важливе значення для створення штамів із заданими ознаками мають **методи направленої передачі генетичної інформації** до клітини-реципієнта (трансформація, трансдукція, кон'югація). Однак обмін ділянками ДНК у цих випадках обмежений видовими особливостями представників і має однонаправлений характер. Цей бар'єр можна подолати, використовуючи позахромосомні молекули ДНК, здатні до автономної реплікації (плазмід), а також **метод злиття протопластів**. У першому випадку переносниками (векторами) чужорідної ДНК до бактерійної клітини слугують плазмід, що є основою **векторної трансформації клітин**. Якщо гібридна плазмід (вектор) проникне до бактерійної клітини і буде копіюватися, то разом з нею копіюватиметься і чужорідна ДНК. Потомство клітини, що містить гібридну ДНК, генетично однорідне, воно утворює клон. Відповідно цей метод отримав назву **клонування генів**. Він дає змогу вводити до клітини бактерій не тільки генетичну інформацію інших мікроорганізмів, а й вищих організмів, і одержувати білки тварин та людини (інсулін, соматотропін, інтерферон та ін.).

Векторами для внесення чужорідної інформації у бактерійну клітину можуть слугувати не тільки модифіковані плазмід, а й космід, бактеріофаг λ , фаг P1, фаг μ тощо.

Технологія рекомбінантних ДНК (її називають також молекулярним клонуванням, чи генною інженерією) – це сукупність експериментальних процедур, які дають змогу здійснити перенесення генетичного матеріалу з одного організму до іншого. Зазвичай експерименти проводять за такою схемою:

- Із організму – донора потрібних генів – екстрагують нативну ДНК (клонувана ДНК, вбудовувана ДНК, ДНК-мішень, чужорідна ДНК), піддають її ферментативному гідролізу (розщеплюють, розрізають) і з'єднують (лігують, зшивають) із іншою ДНК (вектор для клонування, клонований вектор) з утворенням нової, рекомбінантної молекули (конструкція “клонований вектор – вбудована ДНК”).
- Цю конструкцію вводять у клітину-господар (реципієнт), де вона реплікується і передається потомкам. Цей процес називається трансформацією.

- Ідентифікують і відбирають клітини, які несуть рекомбінантну ДНК (трансформовані клітини).
- Отримують специфічний білковий продукт, синтезований клітинами-господарями, що є підтвердженням клонування шуканого гена.

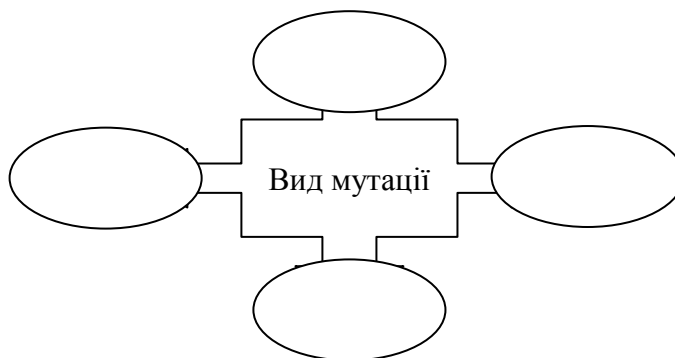
Метод гібридизації соматичних клітин дає змогу отримати рекомбінанти, що мають властивості обох батьківських форм. Із цією метою одержують протопласти, індукують їхнє злиття шляхом обробки поліетиленгліколем та здійснюють відбір на селективних середовищах. Злиття протопластів є одним з основних методів скерованого одержання штамів мікроорганізмів із заданими ознаками.

Практичні завдання

1. Заповніть таблицю, вказавши генно-інженерні методи конструювання штамів мікроорганізмів та особливості їх застосування.

Генно-інженерні методи конструювання штамів мікроорганізмів	Особливості застосування

2. Заповніть схему, вказавши, що використовується у конструюванні мікробних продуцентів.



3. Заповніть таблицю, вказавши методи селекції штамів мікроорганізмів.

Метод селекції	Принцип методу

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Мікроорганізми здатні утворювати у процесі життєдіяльності різні продукти обміну, які є цінними для діяльності людини завдяки набору різних:
- а) ферментів;
 - б) нуклеїнових кислот;
 - в) вторинних метаболітів.

2. Для селекції мутантних штамів мікроорганізмів використовують методи:

- а) висівання чутливих клітин на поживний агар, який містить антибактерійний агент;
- б) відбитків (реплік);
- в) пеніциліновий.

3. За допомогою якого методу отримують ауксотрофні мутанти:

- а) висівання чутливих клітин на поживний агар, що містить антибактерійний агент;
- б) відбитків (реплік);
- в) пеніцилінового.

4. У тисячі разів підвищити частоту мутацій можна, використовуючи:

- а) генетичну рекомбінацію;
- б) мутагени;
- в) ауксотрофні мутанти;
- г) ревертанти.

5. Результати мутацій можуть проявлятися у різних змінах метаболізму клітини. Назвіть ці зміни:

- а) підвищення рівня синтезу ферментів чи їхньої активності;
- б) блокування подальшого внутрішньоклітинного перетворення метаболіту;
- в) блокування деградації продукту;
- г) забезпечення ефективної секреції продукту з клітини;
- д) посилення позитивної регуляції синтезу продукту.

6. Для виробництва різних мікробних препаратів застосовують:

- 1) природні штами мікроорганізмів;
- 2) мутантні штами, змінені в результаті мутагенезу;
- 3) штами, створені методами генної інженерії.

7. Природні (дикі) штами мікроорганізмів:

- а) не нагромаджують надлишку будь-якого метаболіту, оскільки у них наявні високоефективні регуляторні механізми, що запобігають перевиробництву метаболітів;
- б) нагромаджують надлишок метаболіту в невизначених кількостях.

8. Природні (дикі) штами мікроорганізмів використовують для виробництва:

- а) мікробної біомаси;
- б) вітамінів і антибіотиків;
- в) бактерійних добрив та біоінсектицидів.

9. Векторами чужорідної ДНК у бактерій є:

- а) плазмідни;
- б) нуклеоїди;
- в) фаги;
- г) транспозони.

10. Виберіть речовини, які продукують генно-інженерні штами мікроорганізмів, отримані методом клонування :

- а) інсулін, соматотропін, інтерферон та ін.;
- б) амінокислоти;

- в) вітаміни та каротиноїди;
- г) ферменти.

Завдання для самоконтролю

1. Методи селекції промислових штамів мікроорганізмів.
2. Мутагенез і методи виділення мутантів.
3. У яких випадках для конструювання штама-продуцента використовують індукований мутагенез та ступінчастий відбір?
4. Види мутацій, що використовуються у конструюванні мікробних продуцентів.
5. Види мутагенів, що дають змогу суттєво підвищити частоту виникнення мутацій.
6. Принципи використання мутагенів у селекції мікроорганізмів.
7. Основне завдання селекційної роботи зі штамми-продуцентами.
8. Ступінчаста селекція промислових штамів мікроорганізмів.
9. Основні рівні регуляції біосинтезу метаболітів та використання їхніх закономірностей у селекції мікробних продуцентів цінних речовин.
10. Методи селекції мутантів – надсинтетиків амінокислот.
11. Плазмиди і кон'югація у бактерій.
12. Використання кон'югації і трансдукції у конструюванні промислових штамів мікроорганізмів.
13. Використання трансформації у конструюванні промислових штамів мікроорганізмів
14. Використання методу злиття протопластів у конструюванні штамів – продуцентів речовин.
15. Методи скринінгу клонів.

Література

1. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 127 – 177.
2. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 16 – 46.
3. Буцяк В.І. Основи біотехнології / В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – С. 175 – 329.
4. Дебабов В. Г. Биотехнология : учеб. пособие для вузов. В 8 кн./ под ред. Егорова Н. С., Самуилова В. Д. Кн. 2 : Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. – М. : Высш. школа, 1988. – С. 69 – 133; 180 – 205.
5. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 21 – 38.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 9

Генно-інженерні методи конструювання вищих організмів

Мета: ознайомитися з генно-інженерними методами конструювання та селекцією вищих організмів – рослин і тварин.

План заняття

1. Характеристика методів введення ДНК у клітини рослин.
2. Векторні системи для переносу гетерологічних генів у клітини рослин.
3. Ознаки і властивості генетично модифікованих (ГМО) рослин.
4. Характеристика методів введення ДНК у клітини тварин.
5. Ознаки і властивості ГМО тварин.

Теоретичні відомості

Генетична інженерія пов'язана зі скерованим створенням нових комбінацій генетичного матеріалу. Суть цієї технології полягає у виділенні фрагментів ДНК, їх об'єднанні з векторними системами *in vitro* та наступним введенням цих нових (рекомбінантних) генетичних структур у живу клітину, де новостворений генетичний матеріал здатний розмножуватися і забезпечувати синтез кінцевих продуктів.

Вектори – це молекули ДНК, які здатні переносити включені в них гени у клітину, де ці молекули реплікуються автономно чи після інтеграції їх із геномом. Вирішальну роль у цих експериментах мали методи отримання індивідуальних генів, наробка їх препаративних кількостей шляхом клонування, тобто практично необмеженого розмноження в бактерійних клітинах. Під час розробки цих процедур була створена могутня техніка генної інженерії, яка включає виділення індивідуальних фрагментів ДНК будь-якого походження, їх стабільне відтворення у складі векторів, ідентифікація функцій клонованих таким чином генів, їх зміна і введення в клітини вихідного чи іншого організму. Ця техніка, яка отримала назву також техніки рекомбінантної ДНК, у поєднанні з методами розшифрування первинної структури генів уможливила експерименти з маніпулювання генами безпосередньо на генетичному матеріалі у наукових і практичних цілях.

Генна інженерія на сучасному етапі свого розвитку дає змогу маніпулювати індивідуальними генами, отримувати в пробірці їх нові поєднання, мутації за бажанням експериментатора, переносити гени одних організмів у клітини інших і таким чином конструювати нові біологічні системи, яких ніколи не було в природі.

Схеми переносу генів у рослинні об'єкти мало відрізняються від переносу генів (трансгеноз) у бактерійні клітини, проте для рослинних клітин використовуються два підходи: перенос гена за використання векторів і прямий

перенос гена у протопласти. Для виділення гена використовують ті самі методичні підходи, що й при виділенні гена із клітин бактерій чи тваринних клітин. Для усунення клітинних бар'єрів рослинної клітини при трансгенезі використовують ферментативний лізис. Як вектори при трансгенезі рослинних об'єктів використовують модифіковані Ti-плазмідні *Agrobacterium tumefaciens*, Ri-плазмідні *A. rhizogenes*, деякі віруси.

До методів прямого переносу ДНК відносять бомбардування мікрочастинками, пряме введення генів у протопласти, мікроін'єкцію, електропорацію, злиття ліпосом. Бомбардування мікрочастинками – це простий та дешевий метод, який використовується для широкого кола рослин і тканин. Пряме введення генів у протопласти рослин використовується для введення генів тільки у протопласти рослинних клітин, із яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини. Мікроін'єкції мають обмежене використання, оскільки ін'єкцію можна зробити тільки в одну клітину, а також її можуть проводити тільки спеціалісти. Електропорація використовується для введення генів тільки у протопласти, із яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини.

За використання різних методів трансгенезу отримано нові форми рослин, стійкі до комах-шкідників, вірусів, гербіцидів, несприятливих умов середовища, з уповільненим старінням.

Генетична інженерія тваринних форм скерована на поліпшення селекціонованих ліній тварин шляхом уведення генетично чужорідних генів у їхній геном. Методологія введення генів має свої особливості залежно від об'єкта. Трансгенні технології розроблялися й удосконалювалися на лабораторних мишах. Уведення чужорідної ДНК мишам здійснюється різними методами: 1) за допомогою ретровірусних векторів, які інфікують клітини ембріона на ранніх стадіях розвитку перед імплантацією ембріона у самку-реципієнта; 2) мікроін'єкцією у збільшене ядро спермія (чоловічий пронуклеус) заплідненої яйцеклітини; 3) введенням генетично модифікованих ембріональних стовбурових клітин у передімплантований ембріон на ранніх стадіях розвитку. У деяких випадках при переносі значної кількості генматеріалу використовують штучні дріжджові хромосоми.

За допомогою таких експериментальних підходів були отримані трансгенні корови, вівці, свині, птахи і риби. Припускається, що трансгенез дасть змогу поліпшити генотипи існуючих порід домашньої худоби і виводити породи тварин з новими ознаками. До того ж, можливо, таких тварин, як корови, вівці і кози, вдасться використати як своєрідні “біологічні фабрики” для отримання продуктів клонованих генів, що секретуються у молоко.

Практичні завдання

1. Заповніть таблицю, зазначивши методи введення ДНК у клітини тварин.

Методи введення ДНК у клітини тварин	Принцип методу

2. Заповніть таблицю.

ГМО тварини	Метод генетичної трансформації	Ознаки і властивості ГМО тварин

3. Заповніть таблицю.

ГМО рослини	Метод генетичної модифікації	Ознаки і властивості ГМО рослин

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. Виділення окремих генів із природного матеріалу в складі невеликих фрагментів ДНК було здійснено вперше у:

- а) 1868 р. Мішером і Тонегавою;
- а) 1969 р. Беквітом і Шапхро;
- б) 1972 р. Бергом;
- г) 1973 р. Балтімором і Мізутамі.

2. Химерна ДНК – це:

- а) дві копії однієї й тієї ж послідовності ДНК у складі однієї молекули, що перебувають у протилежних орієнтаціях;
- б) одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотної транскрипції;
- в) штучно створена гібридна молекула ДНК, яка не має аналогів у природі;
- г) нуклеотидна послідовність, яка містить кілька функціональних генів.

3. Трансгенні форми містять:

- а) функціональні гени;
- б) чужорідні гени;
- в) регуляторні гени;
- г) транспозони.

4. Генетична колонізація – це:

- а) інтеграція трансгена у геном клітини з наступним його розмноженням;
- б) здатність фітопатогенів так змінювати метаболізм клітини, що вона починає синтезувати речовини, необхідні для їх життєдіяльності;
- в) зміна фенотипу клітини в результаті трансформації генетично чужорідною ДНК;
- г) розмноження чужорідної ДНК у складі вектора.

5. Векторами для перенесення генів у рослинні клітини є:

- а) бактеріофаги;
- б) Ti-плазмід;
- в) косміди;
- г) бактерії.

6. Мікроін'єкція – це метод введення в ізольовану еукаріотичну клітину ДНК чи інших молекул за допомогою:

- а) векторної трансформації;
- б) бомбардування мікрочастинками;
- в) ультразвуку;
- г) голки.

7. Ту-елемент – це мобільний генетичний елемент:

- а) дріжджів;
- б) бактерій;
- в) вірусів;
- г) *Protozoa*.

8. Геном-репортером називають:

- а) функціональний ген клітини, продукт якого є рецептором;
- б) структурний ген, мутація в якому є причиною конкретного спадкового захворювання;
- в) ген, який спричиняє за певних умов смерть клітини;
- г) ген, який кодує продукт, що легко діагностується.

9. Геномною бібліотекою називають:

- а) сукупність генів гаплоїдного набору хромосом;
- б) сукупність генів диплоїдного набору хромосом;
- в) набір клонованих молекул ДНК, які у сукупності є індивідуальним геномом виду;
- г) сукупність фрагментів ДНК.

10. Векторні системи на основі Ti-плазмід містять:

- а) гени фітогормонів;
- б) ген опіну;
- в) селективний маркерний ген;
- г) сайт ініціації реплікації *E.coli*;
- д) полілінкер (множинний сайт клонування).

Завдання для самоконтролю

1. Основні етапи розвитку генетичної інженерії.
2. Ферменти, які використовуються у генетичній інженерії.
3. Основні напрями отримання і використання трансгенних рослин.
4. Трансформація рослин Ti-плазмідом із *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Векторні системи на основі Ti-плазмід.
6. Фізичні методи переносу генів у рослинні клітини.
7. Основні напрями отримання і використання трансгенних тварин.
8. Методи переносу генів у тваринні клітини.

9. Використання ретровірусних векторів у трансгенезі.
10. Метод мікроін'єкцій ДНК у тваринні клітини.
11. Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин при конструюванні генетично модифікованих тварин.
12. Перенесення генів за допомогою штучних дріжджових хромосом.
13. Методи добору трансформованих клонів.
14. Вектори на основі фага λ і фага M13.
15. Клонотеки (бібліотеки) генів, їх отримання.

Література

1. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 127 – 177.
2. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 211 – 238; 252 – 262.
3. Буцяк В.І. Основи біотехнології / В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – С. 175 – 329.
4. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 197 – 208.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б.Глик, Дж.Пастернак – М. : Мир, 2002. – С. 50 – 77; 371 – 441.
6. Тоцький В. М. Генетика : підруч. / В. М. Тоцький. – 3-є вид., виправ. та допов. – Одеса : Астропринт, 2008. – С. 592 – 609.
7. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 80 – 138, 286 – 429; 460 – 490.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 10

Методи клітинної інженерії

Мета: ознайомитися з методами клітинної інженерії за культивування клітинних культур і конструювання нових та удосконалення існуючих форм вищих організмів.

План заняття

1. Отримання та культивування одношарових первинних культур клітин:
 - дезагрегація тканин рослин і тварин;
 - умови зберігання і транспортування клітин;
 - склад поживних середовищ, призначених для культивування клітин.
2. Характеристика видів клітинних культур, їх застосування.
3. Методичні підходи для отримання генетично змінених культур клітин:
 - клонування методом ядерного переносу;
 - отримання гібридних клітин, гібридом;
 - метод трансплантації ембріонів;
 - методи створення химерних тварин.
4. Методичні підходи для отримання трансгенних форм тварин і рослин:
 - методи трансгенозу клітин тварин;
 - методи трансгенозу клітин рослин.

Теоретичні відомості

Клітинна інженерія (КІ) – це напрям сучасної біотехнології, який включає сукупність експериментальних процедур та технологій із різними видами клітин і типами тканин, скерованих на отримання за їхнього використання біологічно активних речовин (БАР) або їхнє поліпшення, удосконалення чи зміну, набуття нових властивостей та ознак. Метою КІ є конструювання клітин нового типу на основі їх культивування, гібридизації та реконструкції.

Розвитку клітинної інженерії сприяла розробка методу культур тканин у 50-ті рр. XX ст. та широке впровадження його у вірусологічну практику. З цього часу почалося масове культивування клітин із метою створення вірусних вакцин. Зростаючий попит на імунологічні препарати привів до створення промислового виробництва вакцин та імунодіагностичних препаратів на основі використання клітин людини та тварин.

Окремим напрямом КІ є використання культур тканин для отримання біологічно активних речовин. Здатність до синтезу тих чи тих активних речовин мають диференційовані клітини, які спеціалізуються на виконанні певної функції. Так, клітини ендокринних залоз синтезують та виділяють гормони, клітини кишкового епітелію – травні ферменти, лімфоцити – антитіла та ін. Із культур тканин виділяють цілий ряд імуnoreгуляторних речовин, у тому числі інтерлейкіни, Т- і В-активіни, інтерферони. Із культур

імунокомпетентних клітин виділяють і інші імуномодулятори, імуномедіатори, а також низку неспецифічних біологічно активних речовин – лізоцим, комплемент, простагландини та ін. До того ж культури клітин є моделлю для розв'язання цілого ряду теоретичних питань, таких як природа та властивості імунокомпетентних клітин, кооперації клітин імунітету, імунорегуляції. Використовуючи культури тканин, досліджують проблеми розвитку та диференціації клітин і тканин, малагнізації клітин, регуляції в нормі та при патології тощо.

Культури тканин застосовуються для трансплантації тканин людини і тварин. Успішно використовують культури тканин для трансплантації підшлункової залози, шкіри тощо. У поєднанні з методами культивування клітин поза організмом це дало змогу накопичувати матеріал *in vitro* та зберігати його у **банку трансплантаційних клітин** упродовж років.

Нові можливості відкриваються перед селекцією сільськогосподарських тварин при використанні трансплантації ембріонів, що у поєднанні з методикою індукції суперовуляції дав змогу значно підвищити відтворювальний потенціал самок деяких видів тварин. До того ж техніка трансплантації ембріонів є ефективним селекційним інструментом при акліматизації ввезених порід тварин і при отриманні не тільки міжпородного, а й міжвидового потомства.

Більший потенціал у цьому плані має техніка копіювання дорослих форм із відомою продуктивністю. Із цією метою практикують техніку пересадки ядер соматичних клітин в енукейовані яйцеклітини. Далі таку яйцеклітину з пересадженим ядром можна розмножити *in vitro* так само, як і окремі бластомери. Велика перспектива цього напряму полягає в тому, що він виключає необхідність перевірки потомків на стать, продуктивні та інші якості.

Одним зі шляхів КІ є отримання трансгенних організмів – рослин і тварин, методи якого дають змогу більш направлено змінювати геном організмів, порівняно із традиційними методами селекції. Для цієї мети розробляються такі методичні підходи: використання тотипотентних клітин як носіїв модифікованого чи направлено зміненого геному; введення у чоловічий пронуклеус клонованих еукаріотичних генів у складі бактерійних плазмід.

Культитивування клітин рослин є порівняно молодого галуззю біотехнології. Особливістю клітинних культур рослин є їх здатність до тотипотенції, за якої в певному середовищі та за певних умов з окремої клітини можна регенерувати цілу рослину. Подібна властивість відсутня у клітин тварин. Цей феномен тотипотенції використовується для розмноження рослин через культуру тканин і клітин. Таке мікроклональне розмноження рослин використовують для створення колекцій генотипів, необхідних для подальшої роботи у генетиці та селекції.

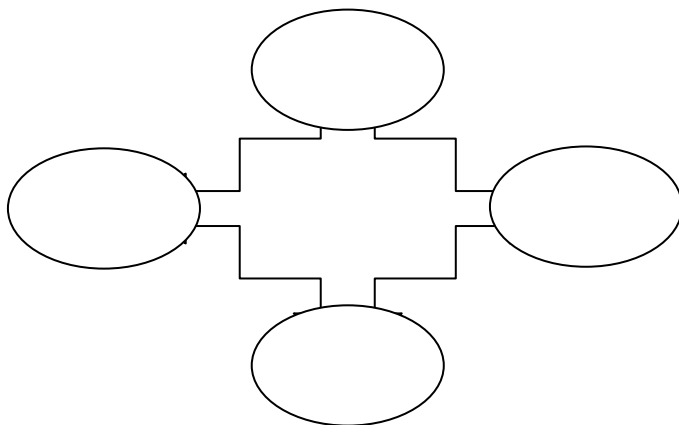
Нові форми рослин отримують за допомогою парасексуальної гібридизації шляхом злиття протопластів. Суть цього методу полягає в тому, що як батьківські використовуються не статеві, а соматичні клітини рослини. При цьому способі гібридизації вдається подолати не тільки міжвидові, а й міжродові бар'єри несхрещуваності.

Таким чином, до основних напрямів клітинної інженерії відносять:

1. Отримання БАР за допомогою культур клітин та тканин рослин *in vitro*.
2. Мікроклональне розмноження й оздоровлення рослин. Створення кріобанків рослинних клітин та тканин.
3. Селекція рослин на клітинному рівні – мутагенна обробка клітин і протопластів, злиття протопластів та отримання гібридних клітин, їх регенерація до стадії дорослих мутантних чи гібридних рослин.
4. Отримання клонованих форм тварин.
5. Отримання трансгенних тварин і рослин.

Практичні завдання

1. Зобразіть схематично послідовність етапів отримання одношарових первинних культур клітин із кусочка тканини рослини.
2. Зазначте на схемі галузі, у яких застосовуються ГМО-рослини.



3. Заповніть таблицю, вказавши види трансгенних форм рослин та їх набуті ознаки чи властивості.

Види трансгенних форм рослин	Ознаки / властивості трансгенних форм рослин

Тестові завдання

Виберіть правильну відповідь:

1. При конструюванні трансгенних мишей методом генетичної модифікації ембріональних стовбурових клітин:
 - а) стовбурові клітини виділяють на стадії морули;
 - б) трансген в клітину вводять у складі вектора;
 - в) для відбору трансфікованих клітин їх висівають на ГАТ-середовище;
 - г) трансген вбудовується в хромосому клітини шляхом гомологічної рекомбінації.
2. Вівця Доллі отримана методом:
 - а) ядерного переносу;

- б) злиття яйцеклітини і сперматозоїда *in vitro*;
- в) генетичної модифікації ембріональних стовбурових клітин;
- г) гібридизації соматичних клітин.

3. Мієлоїдні клітини у складі гібридоми мутантні за геном:

- а) гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази;
- б) дигідрофолатредуктази;
- в) аміноптерину;
- г) гіпоксантину.

4. Клітинна реконструкція – це:

- а) штучне об'єднання цілих клітин з утворенням гібридного генома;
- б) збереження життєздатності окремих клітин поза організмом;
- в) створення життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин;
- г) сукупність маніпуляцій, пов'язаних із реорганізацією геному клітини.

5. Культура клітин – це сукупність:

- а) генотипово однакових клітин;
- б) фенотипово однакових клітин;
- в) клітин, біохімічно пов'язаних між собою;
- г) клітин, фізіологічно пов'язаних між собою.

6. Уперше культуру клітин було отримано:

- а) Ендерсоном у 1947 р.;
- б) Гаррісоном у 1907 р.;
- в) Іглом у 1955 р.;
- г) Гарднером у 1968 р.

7. До первинних культур клітин належать ті, що:

- а) можуть існувати поза організмом довгий час (десятки років);
- б) отримані з ембріональних тканин і зберігають тривалий час вихідні біологічні властивості, в т.ч. і постійний диплоїдний набір хромосом;
- в) отримані з будь-якого органа, але через 2 – 3 тижні гинуть;
- г) походять із мутантних клітин і мають здатність розмножуватися нескінченно довго.

8. Клітинну масу для культивування одержують шляхом обробки відповідного органа:

- а) пепсином;
- б) трипсином;
- в) пеніциліном;
- г) лізоцимом.

9. Клон – це:

- а) сукупність усіх клітин;
- б) група клітин, які утворилися з однієї клітини;
- в) клітини, одержані за допомогою гібридизації;
- г) клітини, одержані шляхом реконструкції.

10. Гібридома – це клітинний гібрид, одержаний при злитті:

- а) двох соматичних клітин;
- б) нормальної антитілотвірної клітини і пухлинної клітини мієломи;
- в) двох пухлинних клітин;
- г) двох нормальних антитілотвірних клітин.

Завдання для самоопрацювання

1. Що таке калюсна культура? Вкажіть її властивості.
2. Наведіть приклади використання калюсних культур.
3. Що таке проліферація клітин у культурі?
4. Які способи отримання протопластів Ви знаєте?
5. Які переваги і недоліки мають різні способи культивування протопластів?
6. Які сполуки використовують для індукції злиття протопластів?
7. Охарактеризуйте методи злиття протопластів.
8. Охарактеризуйте методи отримання безвірусного посівного матеріалу у рослинництві.
9. Як відбувається регенерація рослин із протопластів?
10. Назвіть здобутки у конструюванні трансгенних форм рослин.
11. Перелічіть недоліки та перспективи створення трансгенних форм організмів.
12. Які гібриди можна отримати методом гібридизації соматичних клітин? Наведіть приклади.
13. Дайте характеристику процесу парасексуальної гібридизації у мікроорганізмів та вищих рослин.
14. Охарактеризуйте методи культивування культури тваринних тканин.
15. Наведіть приклади використання культури тваринних і рослинних тканин для виробництва біологічно-активних речовин.
16. Дайте характеристику методу трансплантації тваринних ембріонів у клітинній інженерії.
17. Охарактеризуйте метод трансплантації ембріонів та вкажіть здобутки у цьому напрямі.
18. Охарактеризуйте методи створення химерних тварин та вкажіть перспективність цього напрямку.
19. Опишіть гібридизацію соматичних клітин тварин, галузі їх застосування.
20. Що таке кріобанки? Що Ви знаєте про створення кріобанків в Україні?

Література

1. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. / за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – С. 84 – 124.
2. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 137 – 180.

3. Буцяк В. І. Основи біотехнології / В. І. Буцяк, А. Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – С. 101 – 173; 330 – 343.
4. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – С. 137 – 142.
5. Глазко В.И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека / В. И. Глазко. – К., 2002. – С. 98 – 200.
6. Евтушенков А.Н. Введение в биотехнологию : курс лекций / А. Н. Евтушенков, Е. К. Фомичев. – Мн. : БГУ, 2002. – С. 94 – 103.
7. Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко, М. В. Гусев, А. Ф. Киркин, Т. Г. Корженевская, Е. Н. Маркарова. – Т. 3 – М. : Высш. школа, 1987. – С. 13 – 88.
8. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. М. Новак, А. В. Кунах. – К. : ПоліграфКолсантинг, 2003. – С. 35 – 72; 207 – 240; 321 – 354; 367 – 482.
9. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – К. : Наук. думка, 1990. – С. 10 – 228.

ЗАВДАННЯ ПІДВИЩЕНОЇ СКЛАДНОСТІ

1. Яка найбільш імовірна нуклеотидна послідовність, що кодує наведену амінокислотну послідовність: MAGGTWYQLFPRKMWNDSTLHPFILPM-NVAG?
2. Виберіть амінокислотну послідовність, якій відповідає така нуклеотидна послідовність: GCGAUCGACGAUGUUUCUAAAAGUAUC-
UCAUCGAAAUGAGGGUUCGUAAUAGCGACCCGGGCG?
3. Що таке ТАТА-бокс?
4. Опишіть основні елементи ДНК, які відповідають за транскрипцію евкаріотичних структурних генів.
5. Що таке ендонуклеази рестрикції II типу і чому вони є такими важливими для технології рекомбінантних ДНК?
6. При обробці кільцевої плазмиди pCEL1 різними рестриктазами та їх комбінаціями отримують такі фрагменти (розміри наведені у парах нуклеотидів): *EcoR1* – 6,0; *BamH1* – 6,0; *HindIII* – 6,0; *HaeII* – 3,0 і 1,0; *EcoR1* і *HaeII* – 2,0 і 1,0; *EcoR1* і *HindIII* – 3,5 і 2,5; *EcoR1* і *BamH1* – 4,5 і 1,5; *BamH1* і *HindIII* – 5,0 і 1,0; *BamH1* і *HaeII* – 3,0; 1,5 і 0,5; *HindIII* і *HaeII* – 3,0; 1,5 і 0,5. Використовуючи ці дані, побудуйте рестрикційну карту плазмиди pCEL1.
7. Здебільшого банк клонів створюють лігуванням плазмідного вектора, який піддають повному гідролізу за допомогою *BamH1* з хромосомною ДНК, частково гідролізованою рестриктазою *Sau3A1*: а) чому в цьому експерименті використовується два різних ферменти? б) що таке частковий гідроліз і як його проводять? в) чому його так часто використовують для створення банків клонів?
8. Чому рестриктовану плазмідну ДНК перед лігуванням часто обробляють лужною фосфатазою?
9. Опишіть способи введення рекомбінантних плазмід у грамнегативну бактерію, наприклад *Escherichia coli*.
10. Які дві стратегії хімічного синтезу гена завдовжки 0,5 т.п.н. Ви можете запропонувати? Яку з них ви оберете?
11. Що таке дидезоксинуклеотиди? Як з їх допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК?
12. Як визначають нуклеотидну послідовність клонованої ДНК за допомогою векторної системи на основі фага M13?
13. Як, приєднуючи ферменти до моноклональних антитіл чи їх Fv-фрагментів, можна отримати лікарські препарати?
14. Як отримати моноклональні мишачі антитіла, максимальні близькі за структурою до антитіл людини? Чому вони так потрібні?
15. Як підвищити кількість триптофану, що синтезується *Corynebacterium glutamicum*?
16. Як за допомогою генноінженерних методів модифікувати *Zymomonas mobilis*, щоб можна було використовувати цей мікроорганізм для отримання етанолу з ксилози?

17. Відібравши три штами *Pseudomonas*, один з яких використовує фенол як єдине джерело вуглецю при 0°C, другий розщеплює антрацен з утворенням катехолу при 35 °C, а третій розщеплює *n*-толуол з утворенням протокатехоата при 35 °C, запропонуйте стратегію створення штама, котрий зможе використати як єдине джерело вуглецю фенол, антрацен чи *n*-толуол при 0°C.

18. Як модифікувати штам *Pseudomonas*, який має плазмиду pWWO і не здатний розщеплювати 4-етилбензоат, щоб він міг утилізувати цю сполуку?

19. Які параметри потрібно строго контролювати при оптимізації процесу ферментації?

20. Чому Ti-плазмиду *Agrobacterium tumefaciens* використовують для створення вектора – переносника чужорідного гена у хромосомну ДНК рослини?

21. Чим відрізняються бінарна та коінтегративна векторні системи?

22. Що таке репортерні гени і як вони використовуються при трансформації рослинних клітин?

23. У чому полягає метод бомбардування клітин мікрочастинками, який використовується для трансформації рослин?

24. Запропонуйте кілька стратегій створення рослин, стійких до комах-шкідників.

25. Як за допомогою антизмістової РНК можна забезпечити стійкість рослин до специфічних вірусів?

26. Яким чином інгібітори протеаз, інгібітор амілази і холестеролоксидаза захищають рослини від комах-шкідників?

27. Що таке миші з «нокаутним» геном? Як і для чого отримують таких мишей?

28. Які переваги і недоліки трансгенних мишей як модельних систем для дослідження захворювань людини?

29. Як молочна залоза може бути використана як «біореактор» для синтезу комерційних продуктів?

30. Що таке генетичний поліморфізм? Чому поліморфні локуси важливі для картування генів захворювань людини?

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – 364 с.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 257 – 265, 316 – 343.
3. Промышленная микробиология / под ред. Егорова Н.С. – М. : Высш. школа, 1989. – С. 236 – 283; 586 – 617.
4. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 13 – 197.

ВИБІРКОВІ ВІДПОВІДІ ДО ЗАВДАНЬ ПІДВИЩЕНОЇ СКЛАДНОСТІ

5 – ендонуклеази рестрикції II типу є важливими для технології рекомбінантних ДНК; 8 – рестриковану плазмідну ДНК перед лігуванням обробляють лужною фосфатазою; 10 – є дві стратегії хімічного синтезу генів: фосфаттриєфірна і фосфатдиефірна; 11 – дидезоксинуклеотиди – це нуклеозидтрифосфати, позбавлені 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглецевих атомах вуглеводневого кільця. З їх допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК методом Сенджера; 15 – підвищити синтез триптофану *Corynebacterium glutamicum* можна шляхом блокування утворення амінокислот одного метаболічного шляху; 16 – потрібно генноінженерними методами клонувати гени утилізації ксилози у *Zymomonas mobilis*, щоб можна було використовувати цей мікроорганізм для отримання етанолу з ксилози; 18 – модифікувати цей штам *Pseudomonas* можна, ввівши у нього додаткову плазмиду, яка забезпечить розщеплення 4-етилбензоату; 19 – параметри, які потрібно строго контролювати при оптимізації процесу ферментації (температура, аерація, склад і рН середовища); 20 – Ті-плазміда *Agrobacterium tumefaciens* доцільна для створення вектора, тому що здатна переносити та інтегруватися у геном рослинної клітини; 22 – репортерні гени дають змогу виявити, що певна генетична конструкція успішно введена в клітину, орган чи тканину; 23 – метод бомбардування клітин мікрочастинками ефективно використовується для трансформації рослин для введення ДНК в їх клітини за допомогою вольфрамових чи золотих кульок. ДНК осаджують, «покривають» нею кульки й «обстрілюють» ними клітини; 25 – за допомогою антизмістової РНК можна забезпечити стійкість рослин до специфічних вірусів; 26 – інгібітори протеаз, інгібітор амілази і холестеролоксидаза захищають рослини від комах-шкідників; 27 – миші з «нокаутним» геном позбавлені певного гена; 28 – трансгенні миші є зручною моделлю для дослідження захворювань людини; 29 – молочна залоза може бути використана як «біореактор» для синтезу комерційних продуктів; 30 – поліморфні локуси важливі для картування генів захворювань людини.

СЛОВНИК ОСНОВНИХ ТЕРМІНІВ І ПОНЯТЬ

Адаптор (Adaptor) – 1. Синтетичний, дволанцюговий олігонуклеотид з одним тупим кінцем і одним липким. Після пришивання адаптера тупим кінцем до ДНК-мішені останню можна вбудовувати у відповідний вектор, використовуючи її липкий кінець. 2. Синтетичний одноланцюговий олігонуклеотид, у якого після самогібридизації з'являються липкі кінці і внутрішній сайт для ендонуклеази рестрикції. Коли адаптор вбудовується у вектор клонування, в останнього з'являється новий сайт рестрикції.

Активатор (Activator) – 1. Речовина, що стимулює транскрипцію специфічного гена чи оперона. 2. Білок, що зв'язується з оператором і пришиває транскрипцію; використовується також назва “активаторний білок”.

Алостерична регуляція (Allosteric regulation) – регуляція активності ферменту, що здійснюється ефекторною молекулою, яка зв'язується з ділянкою в молекулі ферменту, котра віддалена від активного центру.

Альтернативний сплайсинг (Alternative splicing) – з'єднання екзонів певного гена в різних комбінаціях з утворенням відмінних між собою зрілих молекул мРНК.

Амплікон (Amplicon) – плазмідний вектор вірусу простого герпесу I типу.

Антипаралельна орієнтація (Antiparallel orientation) – протилежна направленість ($5' \rightarrow 3'$ і $3' \rightarrow 5'$) ланцюгів у дволанцюгових молекулах нуклеїнових кислот.

Антифризний білок (Antifreeze protein) – білок, багатий на аланін, який утворюється в печінці деяких організмів і запобігає замерзанню плазми крові. Виявлений також у клітинах деяких комах, рослин і бактерій, де він регулює утворення кристалів льоду при низьких температурах.

Аутологічні клітини (Autologous cells) – клітини, отримані від певного організму, культивовані, можливо, генетично змінені і знову введені в організм донора.

Arabidopsis thaliana – рослина з невеликим геномом, що використовується як модельна система для вивчення процесів росту і розвитку.

Бакміда (Bacmid) – човниковий вектор на основі генома AcMNPV, що здатний існувати в клітинах *E.coli* і клітинах комах.

Бактеріоцин (Bacteriocin) – речовина, яка синтезується одним мікроорганізмом і знищує клітини іншого мікроорганізму.

Балістична трансфекція (Biolistics, Microprojectile bombardment) – уведення ДНК в клітини рослин і тварин чи органели за допомогою вольфрамових чи золотих кульок. ДНК осаджують, “покривають” нею кульки й “обстрілюють” ними клітини.

Бібліотека кДНК (cDNA library) – колекція клонів кДНК, які синтезують *in vitro* на матрицях мРНК, що походить із однієї тканини чи популяції клітин.

Білки теплового шоку (Heat-shock proteins) – білки, що синтезуються у відповідь на різке підвищення температури.

Білок одноклітинних організмів, БОО (Single-cell protein) – білкові продукти, що синтезуються монокультурою мікроорганізмів і використовуються як харчові добавки до харчового раціону тварин.

Бінарна векторна система (Binary vector system) – двоплазмідна система *Agrobacterium*, яка призначена для перенесення ділянки Т-ДНК, що містить клоновані гени в клітинах рослин. Гени вірулентності локалізовані на одній плазміді, а вбудована ділянка Т-ДНК – на другій.

Біоаккумуляція (Bioaccumulation) – накопичення будь-якої речовини (наприклад, ДДТ) в організмах певного трофічного ланцюга.

Біодеградація (Bioremediation) – знешкодження речовин, що потрапили в наколишне середовище, за допомогою мікроорганізмів.

Біоконтроль (Biocontrol) – процес, у якому використовуються живі організми для обмеження росту і розвитку патогенних мікроорганізмів.

Біомаркер (Biomarker) – біологічна ознака, яка дає змогу з'ясувати прогресування патологічного процесу або ефективність лікування.

Біомаса (Biomass) – 1. Клітинна маса, що утворюється в результаті життєдіяльності живих організмів. 2. Органічна речовина, що може використовуватись як джерело енергії чи хімічних сполук.

Біореактор, ферментер (Bioreactor) – апарат, у якому відбуваються біохімічні реакції за участю живих мікроорганізмів, клітинних екстрактів чи ферментів.

Біотинове мічення (Biotin labeling) – 1. Приєднання молекули біотину до молекули іншої речовини. 2. Включення біотинумісного нуклеотиду в молекулу ДНК.

Блотинг (Blotting) – перенесення розділених молекул з одного середовища (наприклад, гелю) на твердий носій (папір, нітроцелюлозний фільтр).

Бокс Прибнова (Pribnow box) – послідовність нуклеотидів у прокаріот, розташована за 10 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції. Зазвичай складається з 6 нуклеотидів: ТАТААТ.

Бокс Хогнесса (Hogness box) – послідовність нуклеотидів в еукаріот, розташована за 25 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції. Зазвичай складається з 8 нуклеотидів.

Вектор (Vector) – молекула ДНК (наприклад, бактерійна плазміда), що самореплікується і використовується в генній інженерії для перенесення генів від організму-донора в організм-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Вестерн-блотинг (Western blotting) – перенесення білкових молекул, розділених за допомогою гель-електрофорезу, на тверду поверхню.

“Вироджені” праймери (Degenerate primers) – синтетичні олігонуклеотиди, в одному із сайтів яких містяться різні основи.

“Відбиток пальців” (DNA fingerprint) – набір рестрикційних фрагментів ДНК, характерний для певного індивідуума. Для отримання “відбитка” використовують або гель-електрофорез як такий, або в поєднанні з ПЛР-ампліфікацією.

Відкрита рамка зчитування (Open reading frame) – послідовність нуклеотидів, яка не містить кодонів, що термінують; кодує поліпептид чи білок.

Вірус-помічник (Helper virus) – вірулентний штам вірусу, за наявності якого дефектний вірус може розмножуватися в клітині господаря.

Вставка (Insert) – сегмент ДНК, вбудований у вектор клонування.

vir-Гени (vir Genes) – група генів Ті-плазмід, які забезпечують перенесення Т-ДНК у клітину рослин.

Ген-кандидат (Candidate gene) – структурний ген у геномі людини, мутація в якому лише ймовірно (до отримання доказів) є причиною конкретного спадкового захворювання.

Ген-мішень (Target gene) – 1. Клонований ген. 2. Ген, що зазнає специфічної дії. 3. Ген, що цікавить дослідника.

Ген “самогубства”, “суїцидний” ген (Suicide gene) – ген, що спричиняє за певних умов загибель власної клітини.

Генетичний поліморфізм (Genetic polymorphism) – наявність двох або більше алельних форм окремих генів.

Ген-репортер (Reporter gene) – ген, що кодує продукт, який легко можна виявити. Такі гени використовують, щоб переконатися, чи певна генетична конструкція успішно введена в клітину, орган чи тканину.

Гени “домашнього господарства” (Household genes) – набір основних структурних генів, що забезпечують життєдіяльність клітини.

Генна імунізація (Genetic immunization) – індукція в організмі імунної відповіді без уведення антигена, шляхом включення в клітини гена, що кодує білок-антиген.

Генна терапія *ex vivo* (Ex vivo gene therapy) – введення гена (чи групи генів) в ізолювані клітини хворого. Після культивування і трансформації клітини вводять в організм хворого за допомогою трансфузії, інфузії або ін'єкції. Ця процедура дає змогу усувати генетичні дефекти.

Генна терапія *in vivo* (In vivo gene therapy) – введення гена (чи групи генів) безпосередньо в тканину або орган з метою усунення генетичного дефекту.

Генна терапія з використанням клітин зародкової лінії (Germ line gene therapy) – введення гена (генів) у запліднене яйце або клітини ембріона на ранній стадії. Чужорідний ген опиняється в ядрах усіх клітин організму, що розвиваються, у тому числі статевих, і змінює його фенотип.

Генна терапія з використанням “антизмістових” послідовностей (Antisense therapy) – лікування *in vivo* генетичного захворювання шляхом блокування синтезу білка, включенням у геном нуклеотидної послідовності, комплементарної специфічної мРНК.

Генна терапія соматичних клітин (Somatic cell gene therapy) – введення гена в клітину, що відрізняється від статевої, з метою корекції генетичного дефекту.

Геномна бібліотека, банк (бібліотека) генів (Genome library) – набір клонованих фрагментів ДНК, які в сукупності становлять індивідуальний (груповий, видовий) геном. У разі великого генома (ссавці) одержують хромосомоспецифічні бібліотеки.

Генотипування (Genotyping) – визначення усіх алелей і всіх локусів певної хромосоми.

Гетерологічний зонд (Heterologous probe) – сегмент ДНК одного організму, що використовується для скринінгу бібліотеки подібних ДНК іншого організму.

Гібридизація (Hybridization) – спарення двох полінуклеотидних ланцюгів, часто з різних джерел, з утворенням ДНК/РНК- або ДНК/ДНК-гібридів, що стабілізуються водневими зв'язками.

Гібридизація ДНК (DNA hybridization) – спаровування двох молекул ДНК, часто з різних джерел, завдяки утворенню водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами. Використовується для виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей у досліджуваній ДНК.

Гібридний білок, химерний білок (Fusion protein) – продукт клонуваних сумісно двох або більше кодуєчих послідовностей із різних генів. Це один поліпептидний ланцюг.

Гібридний ген (Hybrid gene, chimeric gene) – ген, що складається з частин двох або кількох генів і експресується як єдине ціле з утворенням гібридного (химерного) білка.

Гібридома (Hybridoma) – гібридна клітинна лінія, одержана при злитті нормальних антитілотвірних клітин (лімфоцитів) і мієломних клітин. Здатна до необмеженого росту і синтезу моноклональних антитіл.

Гіперваріабельна ділянка (Hypervariable region) – сайт варіабельної частини важкого чи легкого ланцюга молекули імуноглобуліну, що характеризується високою мінливістю в антитілах різної специфічності порівняно з іншими її сегментами – каркасними ділянками.

Глюкозилювання (Glycosylation) – ковалентне приєднання вуглеводного залишку до білкової молекули.

Група несумісності (Incompatibility group) – група плазмід, представники яких можуть співіснувати в одній клітині.

Група сумісності (Compatibility group) – група плазмід, представники якої не здатні співіснувати в одній бактерійній клітині.

Двоцистронний вектор (Dicistronic vector) – клонований вектор, призначений для експресії двох генів в одній клітині ссавців. Гени перебувають під контролем одного промотора і сигналу поліаденілювання.

Дезоксирибозим (Deoxyribozyme) – молекула ДНК, що має каталітичну активність.

Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаза I (Deoxyribonuclease I, DNase I) – фермент, що розщеплює дволанцюгову ДНК. Використовується для очищення препаратів РНК і безклітинних екстрактів.

Дерепресія (Derepression) – індукція транскрипції гена в результаті пригнічення функцій репресора – блокування його зв'язування з промотором.

Дидезоксинуклеотид, ddNTP (Dideoxynucleotide) – нуклеозидтрифосфат, одержаний синтетичним шляхом і позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглецевих атомах вуглеводного кільця.

ДНК-зонд (DNA-probe) – фрагмент ДНК, мічений тим або тим чином, що використовується для гібридизації зі специфічною ділянкою в молекулі ДНК. Уможливорює ідентифікацію комплементарних йому послідовностей нуклеотидів.

ДНК-лігаза (DNA-lygase) – фермент, що каталізує утворення фосфодіефірного зв'язку між 3'-гідроксильною групою і 5'-фосфатом сусідніх нуклеотидів у місці одноланцюгового розриву молекули ДНК.

ДНК-маркерний сайт, STS (Sequence tagged site) – унікальний для певного локуса олігонуклеотид, який може використовуватися для його ідентифікації методом ПЛР.

ДНК-полімераза (DNA polymerase) – фермент, що каталізує синтез полінуклеотидного ланцюга з окремих нуклеотидів із використанням іншого ланцюга як матриці і ДНК-затравки з вільною 3'-ОН-групою.

ДНК-полімераза Tag (Taq DNA polymerase) – термостабільна ДНК-полімераза (зберігає активність при 95⁰С) бактерії *Thermus aquaticus*. Часто застосовується в методі ПЛР.

Екзонуклеаза III (Exonuclease III) – екзонуклеаза *E.coli*, яка відщеплює нуклеотиди із 3'-кінців дволанцюгової ДНК.

Електропорація (Electroporation) – утворення пор у клітинних мембранах під дією електричного струму. Через ці пори у клітини проникає чужорідна ДНК.

Ендонуклеаза (Endonuclease) – фермент, який гідролізує внутрішні фосфодіефірні зв'язки і розщеплює молекули ДНК та РНК. Ендонуклеази беруть участь у рекомбінації, репарації і рестрикції; в останньому випадку називаються рестриктазами (ендонуклеазами рестрикції).

Епітоп, антигенна детермінанта (Epitope, antigenic determinant) – частина молекули антигена, яка взаємодіє з антигензв'язуючим центром антитіл або Т-клітинним рецептором.

Ерліфтний біореактор (Airlift fermenter) – циліндричний біореактор, у якому перемішування здійснюється потоком газу, що подається знизу.

“Ефект свідка” (Bystander effect) – знищення немодифікованих пухлинних клітин цитотоксичним продуктом, що синтезується сусідніми генетично трансформованими клітинами.

Ефективність трансформації (Transformation efficiency) – показник відношення кількості клітин, що одержали чужорідну ДНК, до кількості трансформуючої ДНК. Виражається числом трансформантів на 1мкг ДНК.

Ємність вектора (Vector capacity) – максимальний розмір ділянки ДНК, що може бути клонований у певному векторі.

Замісна терапія (Replacement therapy) – введення в організм метаболітів, кофакторів, гормонів, що запобігає їх дефіцитові, зумовленому генетичним дефектом.

Зворотна транскриптаза (Reverse transcriptase) – РНК-залежна ДНК-полімераза, що використовує молекулу РНК як матрицю для синтезу комплементарного ланцюга ДНК.

Зворотна транскрипція – полімеразно-ланцюгова реакція (Reverse transcription – polymerase chain reaction) – метод отримання великої кількості кДНК, який складається з двох етапів. Спочатку *in vitro* синтезують кДНК, використовуючи транскриптазу, мРНК як матриці й oligo(dT) – як праймер. Потім кДНК ампліфікують за допомогою ПЛР, використовуючи 2 праймери: один – комплементарний ділянці першого ланцюга кДНК, а інший – другому ланцюгові, що комплементарний першому.

Зонд (Probe) – 1. Сполука, мічена тим або тим способом, що використовується для виявлення споріднених біохімічних молекул у складному зразку. 2. Олігонуклеотид, що використовується для виявлення комплементарних послідовностей за допомогою гібридизації.

Імунологічний скринінг (Screening immunological assay) – скринінг геномної бібліотеки, який базується на виявленні продукту гена-мішені імунологічними методами. Проводиться за відсутності відповідного ДНК-зонда.

Інгібування кінцевим продуктом (End-product inhibition) – інгібування ферменту метаболітом – кінцевим продуктом метаболічного шляху.

Індуктор (Inducer, Inductor) – невелика молекула, яка зв'язується з регуляторним білком-репресором, що веде до дерепресії відповідних генів.

Індукція (Induction) – дерепресія гена або групи генів під дією індуктора.

Інсектицид (Insecticide) – речовина чи живий організм, що вбиває комах.

Інтеграція (Integration) – вбудовування чужорідної ДНК (зазвичай за допомогою гомологічної рекомбінації) у хромосому клітини господаря.

Інтегративний вектор (Integrating vector) – вектор, спеціально сконструйований для того, щоб з його допомогою можна було вбудовувати (інтегрувати) клоновану ДНК у геном клітини-господаря.

Інтрон (Intron) – транскрипційна ділянка гена, що не містить кодонів і вирізається з первинного транскрипта під час процесингу з утворенням функціональної РНК.

Кандидатне картування (Candidate gem cloning) – стратегія ідентифікації гена конкретного захворювання, що ґрунтується на даних про його можливий продукт.

Картування генів (Gene mapping) – визначення положення певного гена на хромосомі відносно інших генів.

Касета (Cassete) – група тандемних, тісно зчеплених, функціонально об'єднаних локусів. Приклад – касетна модель статевих типів у дріжджів.

Клітинна лінія (Cell line) – група клітин, що підтримується у культурі шляхом пересівань.

Клон (Clone) – популяція клітин або молекул, ідентичних одній матричній клітині або молекулі.

Клонування (Cloning) – сукупність процедур, що використовуються для отримання клонів. Клонування багатоклітинних організмів, наприклад, включає пересадку (трансплантацію) ядер соматичних клітин у запліднене яйце з видаленим пронуклеусом.

Клонування генів (Gene cloning) – система методів, що використовуються для отримання клонованих ДНК: виділення потрібного гена з якого-небудь організму, вбудовування його в плазмиду (вектор), уведення в клітину організму-господаря, багатократна реплікація.

Коінтегративна векторна система (Cointegrative vector system) – двоплазмідна система, що використовується для перенесення клонованих генів у рослинну клітину.

Комплементарний гомополімерний «хвіст» (Homopolymeric tail) – гомополімер із дезоксирибонуклеозидмонофосфатів, що приєднується до 3'-ОН-кінців обох ланцюгів фрагмента ДНК з тупими кінцями. Створення комплементарних «хвостів» (наприклад, *poly(A)* у вбудовуваному фрагменті ДНК і *poly(T)* у векторі) дає змогу клонувати фрагмент у складі рекомбінантної плазмиди.

Комплементация (Complementation) – відновлення фенотипу дикого типу (чи близького до нього фенотипу) при об'єднанні в одній клітині двох ДНК з двома рецесивними мутаціями, що перебувають у трансконфігурації.

Конкатемерні молекули (Concatemeric molecules) – довгі молекули ДНК, що складаються з кількох тандемних одиниць, які повторюються. У такій формі перебуває геном деяких фагів під час реплікації.

Конститутивний синтез (Constitutive synthesis) – синтез РНК чи якого-небудь білка, що постійно відбувається в клітині чи цілому організмі.

Контіг (Contig) – безперервний набір клонів, що охоплюють певну ділянку хромосоми або всю хромосому.

Контрансфекція (Contransfection) – уведення в одну еукаріотичну клітину двох різних молекул ДНК. У системі експресії на основі бакуловірусів – процедура одночасного введення бакуловіруса і вектора в клітини комах у культурі.

Конформаційний поліморфізм одноланцюгової ДНК, SSCP (Single-strand conformational polymorphism) – відмінності в конформації одноланцюгових ДНК, що відрізняються одна від одної всього одним нуклеотидом. Аналізовані ДНК піддають денатурації. Денатуровані ланцюги приймають різну конформацію і при гель-електрофорезі мігрують із різною швидкістю.

Кон'югативні плазмиди (Conjugative plasmids) – плазмиди, що здатні передаватися від однієї клітини до іншої під час кон'югації.

Корепресор (Corepressor) – невелика молекула, яка зв'язується з неактивним репресором (аорепресором) з утворенням комплексу, що приєднується до оператора і блокує транскрипцію.

Корончастий гал (Crown gall) – пухлина рослин, спричинена бактеріями роду *Agrobacterium*.

Косегрегація (Cosegregation) – феномен, за якого дві ознаки успадковуються спільно, тобто їх гени при кросинговері не розщеплюються.

Косміда (Cosmid) – вектор, який об'єднує властивості плазмідного вектора і вектора на основі фага λ та містить *cos*-сайти.

Косупресія (Cosupression) – пригнічення експресії специфічного рослинного гена при трансформації рослини додатковою копією цього гена, включеною в “змістову” орієнтацію.

Коферментація (Cofermentation) – одночасне культивування двох мікроорганізмів в одному біореакторі.

Ксенобіотик (Xenobiotte) – сполука, одержана синтетичним шляхом, а не синтезована живим організмом.

Культура (Culture) – популяція клітин чи мікроорганізмів, які вирощують у контрольованих умовах *in vitro*.

Культуральне середовище (Culture medium) – тверде або рідке середовище, яке використовується для вирощування мікроорганізмів *in vitro*.

Лігування (Ligation) – з'єднання двох молекул ДНК за допомогою фосфодієфірних зв'язків. *In vitro* каталізується ферментом ДНК-лігазою фага Т4.

Лігування олігонуклеотидних зондів, ЛОЗ (Oligonucleotide ligation assay) – метод виявлення одонуклеотидних замін у гені-мішені за допомогою коротких олігонуклеотидів, комплементарних протилежним ланцюгам тестованого зразка ДНК. Якщо заміна відсутня, то обидва олігонуклеотиди повністю гібридизуються з ДНК, і після додавання в реакційну суміш ДНК-лігази відбувається їх зшивання (лігування). У противному разі зшивання неможливе.

Лінкер (Linker) – синтетичний олігонуклеотид, що містить сайт рестрикції. Використовується для з'єднання векторної і клонованої ДНК, до кінців якої методом пришивання тупих кінців приєднані лінкери.

Липкі кінці (Cohesive ends) – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, що виступають на кінцях дволанцюгової молекули; утворюються в результаті східчастих розщеплень дволанцюгових ДНК.

Маркерні експресибельні послідовності, EST (Expressed sequence tag) – короткі маркерні послідовності, характерні для кожного експресибельного гена людини. Дають змогу вивчати розміри, різноманітність і транскрипційну активність експресибельних генів людини.

Маркерний ген (Marker gene) – ген з відомою хромосомною локалізацією, що має чіткий фенотиповий прояв (стійкість до антибіотика, ферментативна активність і т.д.).

Маркерний пептид (Marker peptid) – ділянка гібридної білкової молекули, що полегшує ідентифікацію або очищення білка.

Метаболічне навантаження (Metatotic load) – порушення метаболізму організму-господаря в результаті введення в його геном і експресії чужорідної ДНК.

Мітка (Label) – радіоактивний ізотоп чи ліганд, який ідентифікується біохімічними або імунологічними методами (наприклад, флуорофор), що зв'язується з макромолекулою. Дає можливість знайти мічену речовину в зразку.

Метод відбитків (реплік) (Replica plating) – перенесення колоній мікроорганізмів з однієї чашки Петрі в іншу за допомогою оксамитової «печатки» з повним збереженням взаємного розташування колоній.

Метод випадкових праймерів (Random primer method) – спосіб отримання мічених ДНК-зондів, що ґрунтується на застосуванні синтетичних олігонуклеотидів, які містять усі можливі комбінації з шести нуклеотидів, два з них гібридизується з денатурованою ДНК-мішенню.

Мікроін'єкція (Microinjection) – уведення в ізольовану еукаріотичну клітину ДНК або інших молекул за допомогою тонкої голки.

Міні-сателітна ДНК людини (Human minisatellite DNA) – некодуюча ДНК людини, зазвичай містить у великій кількості GC, а також тандемні повтори коротких (завдовжки 9 – 40 п.н.) сегментів.

Мішень (Target) – у широкому значенні – біологічний об'єкт (тканина, молекула, клітина, мікроорганізм), який цікавить дослідника.

Молекулярна діагностика (Molecular diagnostic) – діагностика виявлення молекулярно-біологічними методами патогенного мікроорганізму, специфічної речовини або зміненої нуклеотидної послідовності, яка спричиняє те чи те захворювання.

Моноклональні антитіла (Monoclonal antibodies) – однотипні антитіла, строго специфічні стосовно одного епітопа (антигенної детермінанти). Синтезуються гібридомами – клітинними гібридами, одержаними при злитті нормальних антитілотвірних клітин із мієломною пухлинною клітиною, яка здатна до необмеженого росту. Деякі мієломні клітини синтезують моноклональні тіла самостійно.

Мультилокусна генетична карта, карта зчеплення (Multipoint map, multilocus Jinkage map) – схема, на якій відображено взаємне розташування локусів на хромосомах певного організму.

Негативна регуляція (Negative control) – тип регуляції, за якого транскрипція гена пригнічується регуляторним білком (репресором); відповідно при інактивації білка-регулятора структурні гени залишаються в активному стані.

Неметаболізуючі індуктори (Gratuitous inducers) – речовини, що індукують синтез індукцибельних ферментів, не є для них субстратами, а тому залишаються у вихідному вигляді.

Нозерн-блотинг (Nothern blotting) – перенесення молекул РНК, які зазнали електрофорезу, з гелю на тверду поверхню (нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) із наступною ДНК-РНК-гібридизацією.

“Нокаут” (Knockout) – направлене руйнування гена за допомогою гомологічної рекомбінації.

Нуклеаза S1 (S1 nuclease) – фермент, що специфічно деградує одноланцюгову ДНК.

Одноланцюговий розрив (Nick) – розрив фосфодіефірного зв'язку між сусідніми нуклеотидами в одному ланцюзі ДНК.

Олігонуклеотид, олігомер (Oligonucleotide) – короткий (6 – 10 нуклеотидів) сегмент одноланцюгової ДНК. Зазвичай одержують хімічним синтезом.

Онкоген (Oncogene) – ген, експресія якого призводить до неконтрольованої проліферації (трансформації) клітин.

Оптимізація кодонів (Codon optimization) – модифікація кодонів певного гена без зміни амінокислотної послідовності білка, який його кодує, направлена на те, щоб кодони ефективно “прочитувалися” організмом господаря.

Пакувальна клітинна лінія (Packaging cell line) – клітинна лінія, яка створена для продукування вірусних частинок, що не містять інфекційної нуклеїнової кислоти.

Паліндром (Palindrome) – ділянка дволанцюгової молекули ДНК, обидва ланцюги якої мають однакову нуклеотидну послідовність при зчитуванні від 5'-до 3'-кінця. Такі ділянки часто розпізнаються ендонуклеазами рестрикції II типу.

Параспорульний кристал (Parasporal crystal) – тісно упаковані молекули токсину *Bacillus thuringiensis*, що синтезуються ним при утворенні спор.

Патогенеззалежний промотор (Pathogenesis-related promotor) – промотор рослинних генів, що активізується при інфікуванні рослини патогенами.

Первинна культура (Primary culture) – культура клітин або тканин, відібраних безпосередньо від організму.

Перше антитіло (Primary antibody) – антитіло, що зв'язується з молекулою-мішенню при проведенні імунологічного аналізу (наприклад, за допомогою методу ELISA).

Періодична ферментація (Batch fermentation) – культивування мікроорганізмів під час обмеженого інтервалу часу. Свіже середовище інокують посівним матеріалом і проводять культивування у безперервному режимі, не вносячи нових порцій середовища та не виводячи продуктів обміну.

Періодична ферментація з додаванням субстрату (Red-Batch fermentation) – культивування мікроорганізмів упродовж обмеженого інтервалу часу з періодичним додаванням субстрату і збором продукту тільки після завершення процесу.

Піроген (Pyrogen) – речовина, яка продукується бактеріями і спричиняє підвищення температури у людини.

Плазміда (Plasmid) – позахромосомний генетичний елемент, здатний до довгострокового автономного існування і реплікації. Зазвичай це дволанцюгова кільцева ДНК завдовжки 1 – 200 т.п.н.

Плазміда-помічник (Helper plasmid) – плазміда, яка виконує функції другої плазміди в тій самій клітині. Деякі плазміни-помічники допомагають перенесенню некон'югативних плазмід з клітини донора в реципієнт.

2мкм-плазміда (2 μ m plasmid) – дволанцюгова кільцева плазміда завдовжки 6318 п.н., виявлена в ядрі *Saccharomyces cerevisiae*. На її основі отримано багато плазмідних векторів для дріжджових клітин.

Плазмідна несумісність (Plasmid incompatibility) – механізм регуляції кількості копій плазмід одного типу у бактерійній клітині. Забезпечує

неможливість внутрішньоклітинного існування плазмід, які належать до одної групи сумісності.

Плазмовірус (plasmovirus) – генетична конструкція, що містить ретровірусні гени, які перебувають під контролем 5'-LTR- промотора, а також “терапевтичний” ген і ген *env*, який контролює цитомегаловірусний промотор.

Позитивна регуляція (Positive control) – тип регуляції, за якого регуляторний ген транскрибується тільки за наявності білка-активатора.

Позитивно-негативний відбір (Positive-negative selection) – методика, за якої одночасно відбувається відбір клітин, котрі містять вставку у специфічному хромосомному сайті (позитивний відбір), і “відсів” клітин, що несуть вставку в іншому, неспецифічному сайті.

Позитивний відбір (Positive selection) – відбір клітин за наявності у них маркерного гена, який забезпечує сприятливий ріст на селективному середовищі (наприклад, середовищі з антибіотиком).

Позиційне картування (Positional gene cloning) – одна зі стратегій ідентифікації гена захворювання за відсутності даних про продукт цього гена і яких-небудь генів-кандидатів. У подібних випадках спочатку визначають хромосомну локалізацію (позицію) гена. Далі отримують геномні клони, які охоплюють картований сайт (використовуючи відповідні маркери), ідентифікують і аналізують наявні в них екзони. Використовуючи низку методів (ідентифікація GC-острівців, виявлення екзонів, секвенування, комп'ютерний аналіз і т.д.), визначають, який саме ген відповідає за певне захворювання.

Позиційно-кандидатне картування (Positional - candidate gene cloning) – одна зі стратегій ідентифікації гена захворювання, коли дані про продукт цього гена відсутні, але ген картований у тому самому хромосомному районі, що й уже ідентифіковані гени та EST. Спочатку аналізують сучасні генетичні і транскрипційні карти, щоб виявити кодуючі послідовності (гени, внутрішньогенні EST), які містяться в цьому районі; потім за допомогою аналізу мутацій або будь-якими іншими методами виявляють екзони, зв'язані з певним захворюванням.

Поліаденілювання (Polyadenylation) – ферментативне приєднання залишків аденіну до 3'-кінця молекули евкаріотичної мРНК. Цей багатий на аденін 3'-кінець називається poly(A)-хвостом.

Полівалентна вакцина (Polyvalent vaccine) – вакцина, яка забезпечує імунну відповідь на кілька інфекційних агентів або на різні епітопи однієї молекули.

Полілінкер (Polylinker) – коротка ділянка ДНК, яка містить кілька унікальних сайтів рестрикції для ендонуклеаз; у ці сайти інтегрують чужорідну ДНК (проводять клонування).

Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР (Polimerase chain reaction) – метод ампліфікації специфічного сегмента ДНК з допомогою термостабільної ДНК-полімерази з використанням олігонуклеотидних ДНК-зондів, комплементарних послідовностям протилежних ланцюгів ДНК, які фланкують

ампліфікуючий сегмент. Процес складається із серії циклічно повторюваних реакцій: денатурації ДНК, відпалювання зондів, синтезу ДНК.

Поліморфізм коротких тандемних повторів, STRP (Short tandem repeat polimorfism) – варіабельність блоків із тандемних ди-, три- або тетрануклеотидних повторюваних елементів. При частоті зустрічальності блоків у великій популяції не менше 1% STRP- локуси виявляють за допомогою гель-електрофорезу після проведення ПЛР з використанням праймерів, комплементарних унікальним послідовностям, які фланкують цей локус.

Поліморфний сайт (Polymorphic site) – ділянка хромосоми, представлена в популяції більш ніж одним варіантом із частотою не менше 1%.

Полінуклеотид (Polynucleotide) – лінійний полімер, який складається із 20 і більше нуклеотидів, з'єднаних один з одним фосфодіефірними зв'язками. Полінуклеотидами є, наприклад, молекули ДНК і РНК.

Поліцистронна мРНК (Multigene RNA, polysistronic message) – молекула мРНК, яка кодує більш ніж один білок. Утворюється при транскрипції двох або більше сусідніх генів, які входять до складу одного оперона.

Посттрансляційні модифікації (Posttranslational modifications) – зміни структури білкових молекул після завершення їх синтезу рибосомами. До таких модифікацій належать: фосфорилювання, гліколізування, окиснення цистеїну, відщеплення сигнальних послідовностей тощо.

Праймер (Primer) – короткий олігонуклеотид, який гібридизується з матрицею і є затравкою при її копіюванні.

Праймер-опосередкована прогулянка (“блукаюча затравка”) (Primer walking) – один з методів секвенування довгих сегментів ДНК (>1 т.п.н.) із використанням праймера (затравки), який комплементарний кінцю уже відомої послідовності. На основі даних, отриманих на першому етапі, синтезують новий праймер, що перекривається з кінцем уже секвенованої ділянки, з подальшим його використанням для визначення нуклеотидної послідовності наступної ділянки клонованої ДНК. Цю процедуру повторюють до того часу, поки не секвеноують увесь сегмент.

“Прогулянка по хромосомі” (Chromosome walking) – метод ідентифікації нуклеотидних послідовностей, які фланкують відомі гени; для деяких є олігонуклеотидні зонди. Фланкуючі послідовності використовуються згодом як зонди для ідентифікації послідовностей, що прилягають до них, і т.д.

Проект “Геном людини” (Human Genome Proekt) – міжнародна програма, метою якої є побудова генетичної і фізичної карт генома людини та визначення повної нуклеотидної послідовності ДНК.

Промотор (Promoter) – ділянка молекули ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза, що супроводжується ініціацією транскрипції відповідних генів. Зазвичай розташована перед 5'-кінцем регуляторного гена.

Рамка зчитування (Reading frame) – один із трьох можливих способів зчитування нуклеотидної послідовності у вигляді триплетів. Відкрита рамка зчитування не містить термінуючих кодонів і може транслюватися в білок.

Реактор з механічним перемішуванням (Stirred tank fermenter) – біореактор, у якому для рівномірного розподілу газу по всьому об'єму використовуються мішалки.

Регуляторний білок (Regulatory protein) – білок, що “вмикає” або “вимикає” транскрипцію.

Рекомбінантна ДНК (Recombinant DNA) – молекула ДНК, одержана об'єднанням *in vitro* різнорідних фрагментів ДНК.

Рекомбінантний білок (Recombinant plasmid) – білок, який кодує клонована рекомбінантна ДНК.

Реплікативна форма, РФ (Replicative form) – проміжна форма дволанцюгової вірусної нуклеїнової кислоти, що є матрицею для синтезу ДНК і РНК. Це релаксаційне (відкрите) кільце.

Реплікація (Replication, reduplication) – процес самовідтворення (синтезу) ДНК.

Реплікація за типом “кільця, що котиться” (Rolling circle model), – процес реплікації кільцевих молекул ДНК з утворенням конкатемерної дуплексної ДНК (ДНК, які складаються з кількох тандемно повторюваних одиниць генома).

Репресія (Repression) – один з двох альтернативних (поряд з індукцією) механізмів регуляції генів. Проявляється шляхом пригнічення транскрипції або трансляції завдяки зв'язуванню білка-репресора з оператором.

Репресор (Repressor) – білок, який зв'язується з оператором або промотором певного гена, в результаті чого блокується зв'язування з цими елементами РНК-полімерази.

Рестриктаза, ендонуклеаза рестрикції (Restriction endonuclease), – бактерійний фермент, який розщеплює дволанцюгову молекулу ДНК у специфічних сайтах.

Рестрикційна карта (Restriction map) – діаграма, на якій зображено сайти рестрикції молекули ДНК.

Рибозим (Ribosime) – молекула РНК, яка володіє ферментативною активністю.

РНК-полімераза (RNA polymerase, RNA synthetase) – фермент, який здійснює синтез РНК із рибонуклеозидтрифосфатів. Матрицею може бути ДНК або РНК; відповідні РНК-полімерази називають ДНК- або РНК-залежними.

Сайт інтеграції (клонування) (Cloning site) – специфічна ділянка векторної молекули, в яку вбудовують фрагменти чужорідної ДНК. Дуже часто це унікальний сайт рестрикції.

Сайт рестрикції (Restriction site) – нуклеотидна послідовність у молекулі ДНК, яка розпізнається відповідною рестриктазою. Здебільшого це короткий паліндром.

Сайт-специфічний мутагенез (Site-specific mutagenesis) – внесення *in vitro* мутації в конкретний сайт клонованої послідовності. Уможливорює ідентифікацію функціональних ділянок у молекулах білків і одержання білків із заздалегідь заданими властивостями. Деколи називають олігонуклеотид-направленим мутагенезом.

Самореplikативний елемент (Self-replicating element) – позахромосомна молекула нуклеїнової кислоти, здатна до незалежності від хромосомної ДНК (автономної) реплікації. Прикладом такого елемента є плазмід.

Саузерн-блотинг (Southern blotting) – виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей шляхом перенесення денатурованих молекул ДНК, які піддають електрофорезу, з агарозного гелю на нітроцелюлозний або нейлоновий фільтр за допомогою капілярного ефекту і гібридизації з міченим зондом, комплементарний шуканій послідовності.

Секвенуючий гель (Sequencing gel) – довга пластина поліакриламідного гелю, яка дає змогу проводити електрофоретичне розділення оліго- і полінуклеотидів, довжини яких відрізняються всього на 1 нуклеотид.

СЕРН (Centre d'Etude de Polymorphisme Humain) – центр із вивчення поліморфізму людини, який розташований у Парижі. Містить базу даних щодо генетичної і молекулярно-генетичної мінливості популяцій людини з більшості регіонів земної кулі.

Серотип (Serotype) – антигенна характеристика клітини (бактерії, клітини крові і т. д.), встановлена на основі її взаємодії з антитілами.

Скринінг (Screening) – метод (або комплекс методів) ідентифікації одиничного об'єкта (особини в популяції, клітини з бажаними властивостями, ділянки нуклеотидної послідовності і т.д.) шляхом перевірки великої кількості об'єктів.

Ступеневий розрив (Staggered cut) – розщеплення дволанцюгової ДНК, при якому розриви в комплементарних ланцюгах розміщуються не строго один навпроти іншого, а дещо зміщені.

Субклонування (Subcloning) – перенесення частини вже клонованої молекули ДНК в інший вектор клонування.

Субодинична вакцина (Subunit vaccine) – вакцина, яка містить лише окремі компоненти патогенного мікроорганізму.

“Стрибки по хромосомі”(Chromosome jumping) – один із варіантів методу “прогулянки по хромосомі”, який характеризується тим, що в результаті мутації маркерний ген, котрий використовується для скринінгу, переміщується (стрибає), а це дає змогу виявити нові зчеплені з ним гени.

CG-острівці, HTF-острівці (CpG islands, HpaII tiny fragments) – CG-багаті послідовності розміром до кількох сотень пар; фланкують із 5'-кінця багато транскрипційно активних генів хребетних і містять сайти рестрикції для Hpa II.

Cos-сайти (Cos-sites) – нуклеотидні послідовності на кінцях генома фага λ , необхідні для упаковки ДНК у фагові частинки.

Тандемний повтор (Tandem array) – нуклеотидна послідовність, яка складається з кількох однакових елементів, з'єднаних за типом “голова-до-хвоста”.

ТАТА-бокс (TATA-box) – ділянка, розміщена у промоторній частині генів еукаріот за 25 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції, з якою зв'язана РНК-полімераза. Інша назва – бокс Хогнесса. Аналогом у прокаріот є бокс Прибунова.

Т-ДНК (T-DNA) – фрагмент Ті-плазмід, який вбудовується в ядерну ДНК клітини хазяїна і стабільно її успадковує. Спричиняє утворення пухлин у рослин (корончастий гал).

Температура плавлення T_m (Melting temperature) – температура, за якої відбувається розрив половини водневих зв'язків у полінуклеотидному дуплексі.

Термінальна трансфераза (Terminal transferase, deoxynucleotidyl transferase) – фермент, який каталізує приєднання 3'-кінця молекули ДНК дезоксинуклеозидмонофосфатів. Використовується для клонування кДНК за допомогою комплементарних гомополімерних “хвостів” (*poly(A) – poly(T)*).

Ті-плазміда (Ti plasmid) – плазміда ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, Т-ділянка якої здатна включатися в ядерну ДНК, що призводить до виникнення пухлин.

Трансгенний організм (Transgenic organism) – організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал, уведений методами генної інженерії.

Трансгеноз (Transgenesis) – уведення чужорідного гена в рослинну або тваринну клітину та його передача в ряді поколінь.

Транскрипційне картування (Transcription mapping) – “прив'язка” індивідуальних транскриптів (клонів кДНК експресибельних послідовностей – мішеней) до хромосомних районів за допомогою методу флуоресцентної гібридизації *in situ*, ПЛР і т.д.

Трансфекція (Transfection) – штучне введення в еукаріотичні клітини ізолюваних молекул ДНК.

Трансформація (Transformation) – 1. Перенесення генетичної інформації у бактерійні клітини за участю плазмід або без них, але завжди без участі вірусів; часто веде до змін фенотипу клітини-реципієнта. 2. Перетворення нормальних тваринних клітин у пухлини.

Тупий кінець (Blunt end) – кінець дволанцюгової молекули ДНК, у якого не виступає жоден із ланцюгів.

Ту-елемент (Ty-element) – мобільний генетичний елемент дріжджів (від англ. Transposon of yeast).

Ферментний імуносорбентний аналіз, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), – метод виявлення специфічних молекул у зразку. Зразок фіксують на твердій підставці і додають антитіло, специфічне до маркерної молекули. До другого антитіла приєднують фермент, який перетворює безбарвний субстрат у кольоровий продукт із наступним його кількісним аналізом.

Фізична карта (Physical map) – схема розміщення генів на хромосомі, встановлена за допомогою різноманітних методів (електронна мікроскопія, секвенування, рестрикційне картування). Відстань на такій карті вимірюється кількістю пар нуклеотидів.

Флуоресцеїн (Fluorescein) – флуоресцентний барвник, що часто використовується як мітки для антитіл. Дає змогу візуалізувати антитіла після їх зв'язування з антигеном.

Флуорофор (Fluorophore) – хімічна група, яка відповідає за флуоресценцію такої сполуки.

Фрагмент Кленова (Klenov fragment) – найбільший з двох фрагментів ДНК-полімерази I *E.coli*, утворюється при її протеолітичному розщепленні. Зберігає 5'→3' полімеразну активність і 3'→5' екзонуклеазну. Використовується частково при секвенуванні ДНК.

Функціональне картування (Functional cloning) – ідентифікація гена на основі відомої амінокислотної послідовності його продукту.

Футпринтинг (Footprinting) – метод ідентифікації ділянок ДНК, що специфічно зв'язуються з білками. У його основі – захист ДНК у місцях контакту з білком від ендонуклеазного розщеплення.

Химера (Chimera) – організм, що включає клітини, тканини й органи різних організмів.

Хромосомний сайт інтеграції (Chromosomal integration site) – місце в хромосомі, куди може вбудуватися чужорідна ДНК, часто без жодних наслідків для організму-господаря.

“Цинкові пальці” (Zinc fingers) – ДНК-зв'язуючі домени, які включають по два цистеїнових залишки й один гістидиновий. Ці амінокислоти взаємодіють із йоном цинку, а ділянка поліпептидного ланцюга між ними утворює петлю у формі “пальця”.

Частота трансформації (Transformation frequency) – показник частки клітин у клітинній популяції, які одержали чужорідну ДНК; виражається числом трансформантів до загального числа клітин.

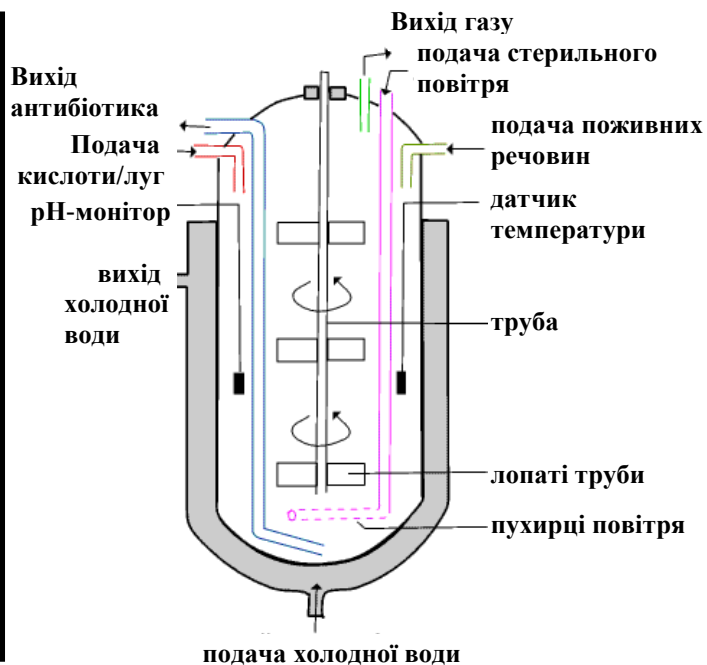
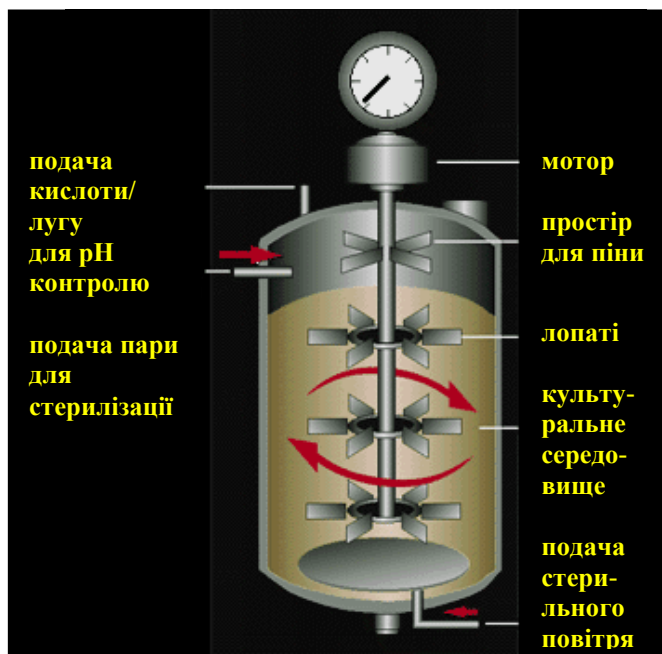
Човниковий вектор (Shuttle vector) – плазмідна ДНК, здатна реплікуватися в клітинах двох різних типів (наприклад, у *E. coli* і клітинах дріжджів).

Ядерне клонування (Nuclear cloning) – отримання живого організму з без'ядерної яйцеклітини з імплантованим диплоїдним соматичним ядром.

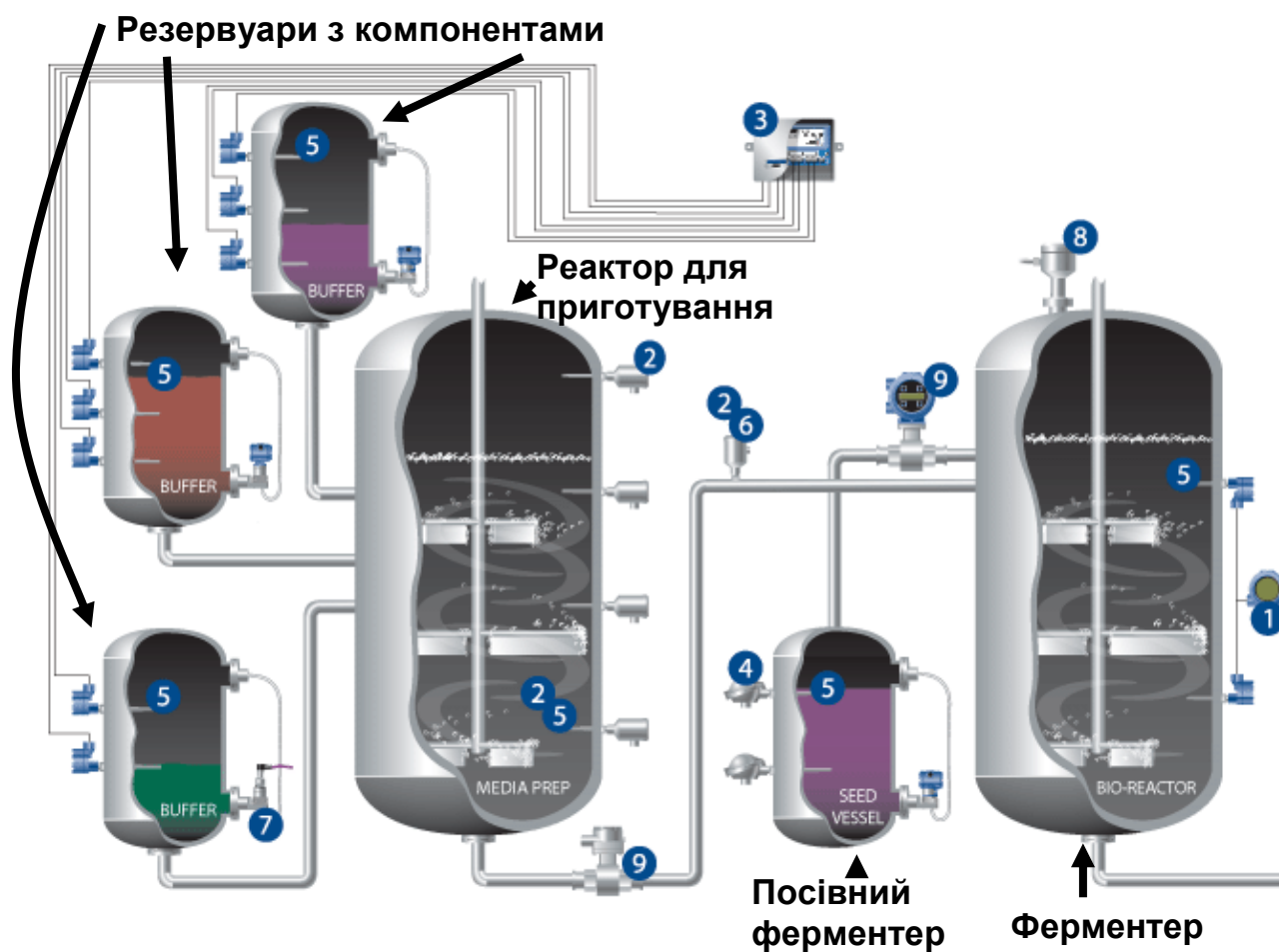
Додатки

Додаток А

Схематичне зображення ферментера



Схематичне зображення біотехнологічної лінії



Технологічна лінія з виробництва етанолу

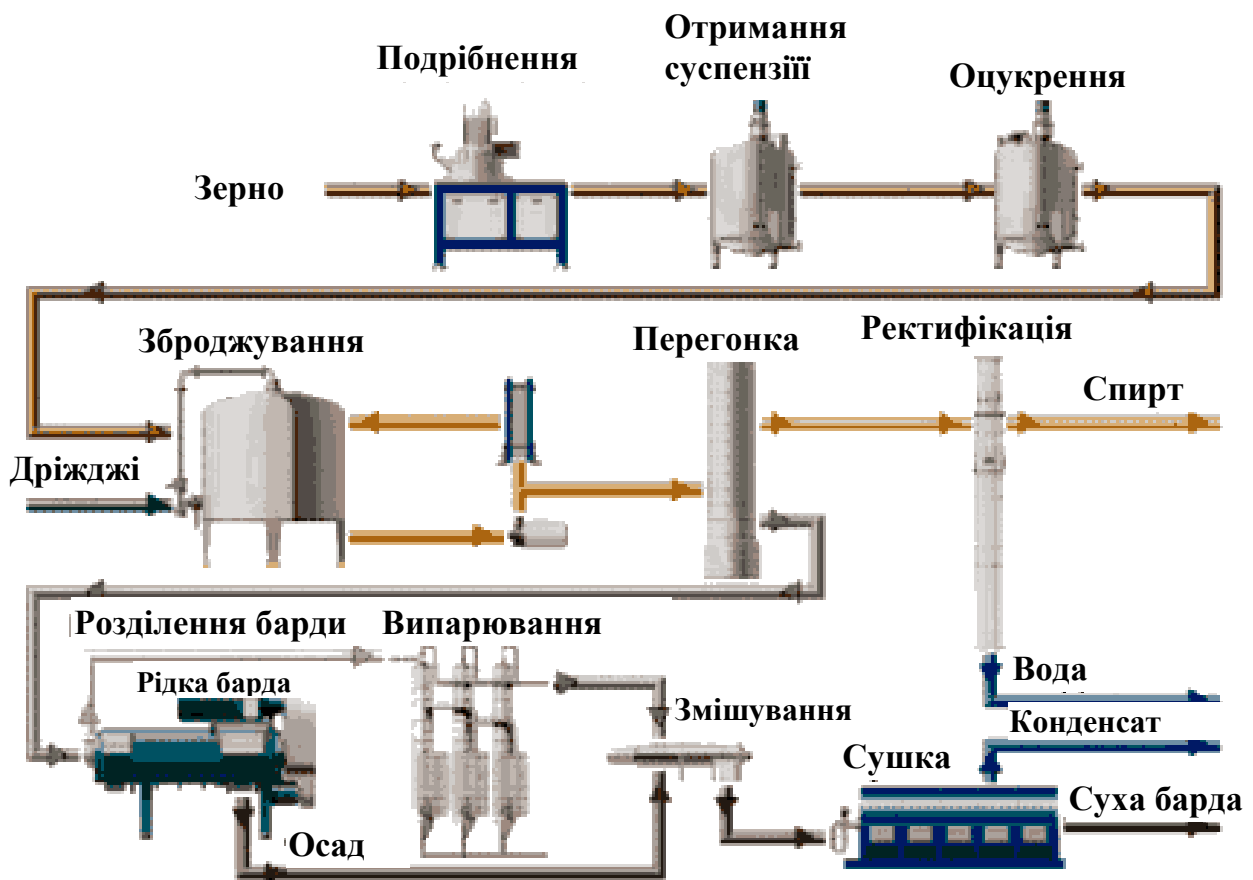
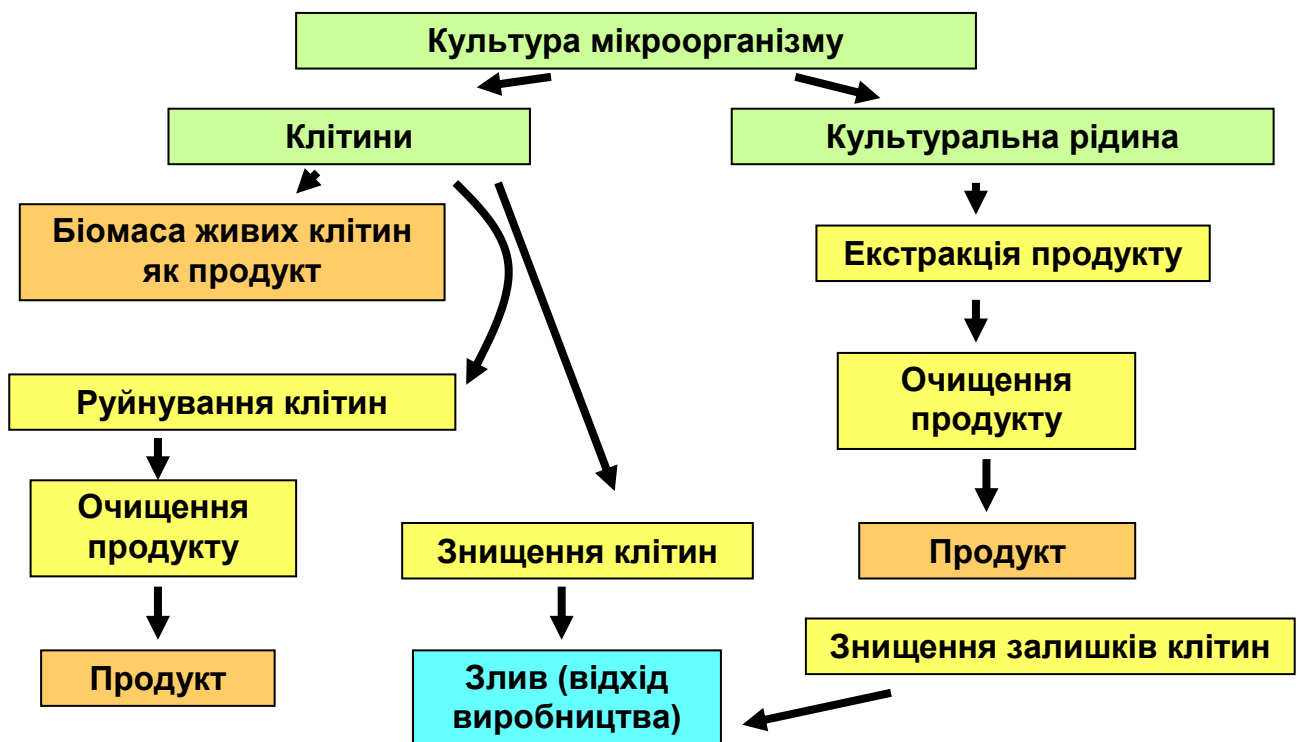
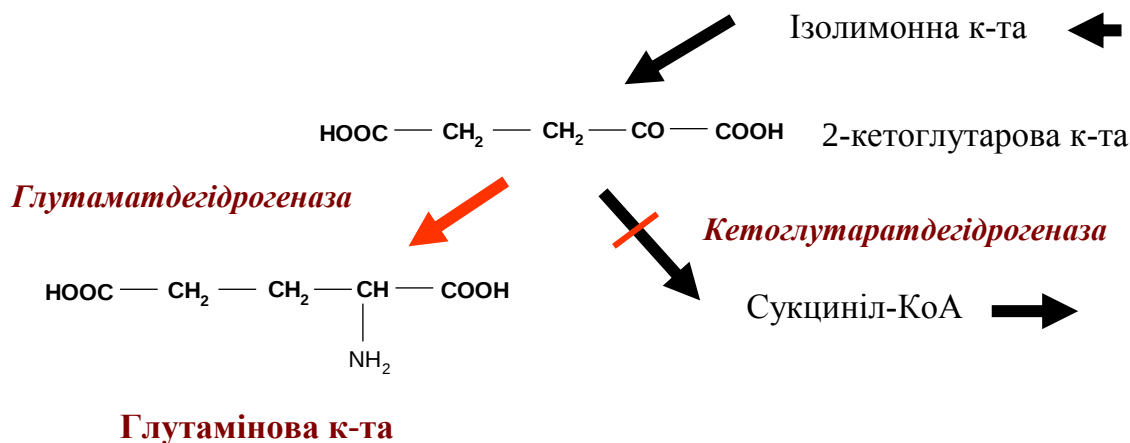


Схема обробки культури для отримання біотехнологічних продуктів



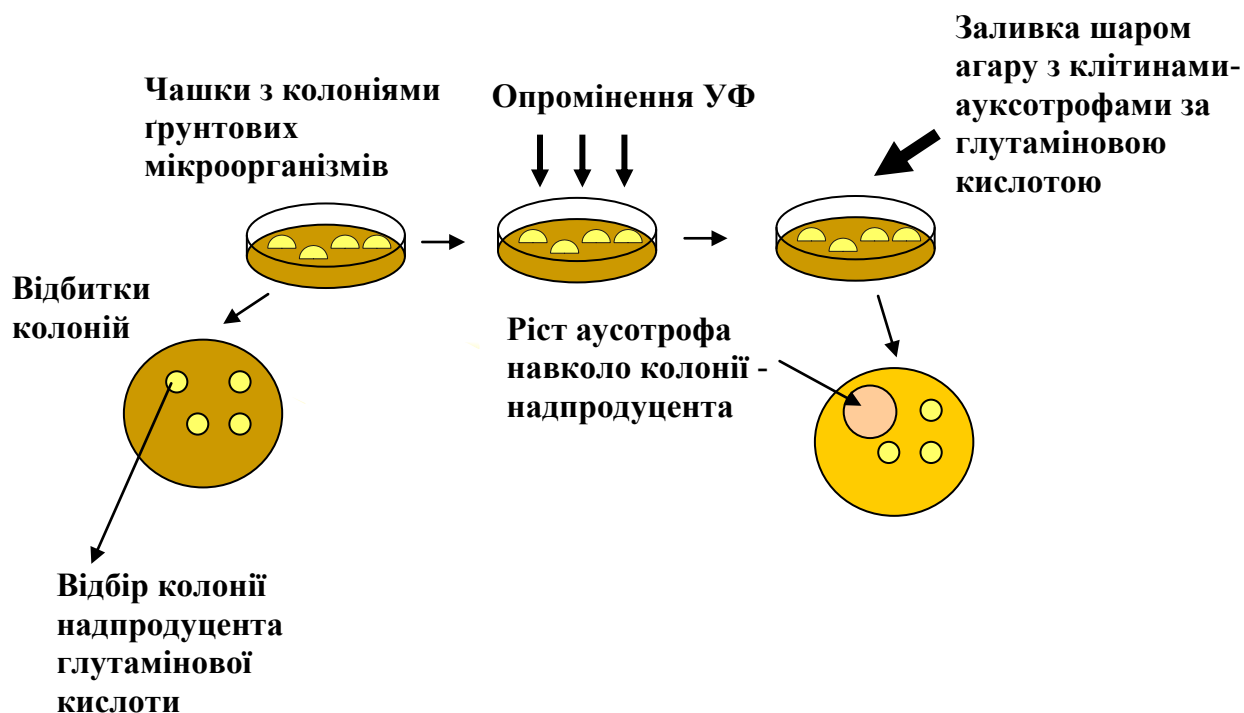
Синтез глутамінової кислоти у *Corynebacterium glutamicum*

□ Попередник глутамінової кислоти – 2-кетоглутарова кислота (метаболіт ЦТК)



Нагромадження глутамінової кислоти коринебактеріями є наслідком:

- Дефектності кетоглутаратдегідрогенази, що зумовлює переважне перетворення 2-кетоглутарової кислоти в глутамінову кислоту, а не в сукциніл-КоА.
- Низької активності системи окислення глутамінової кислоти.

Схема виділення продуцентів глутамінової кислоти *Corynebacterium glutamicum*

Розщеплення коротких фрагментів ДНК рестриктазами

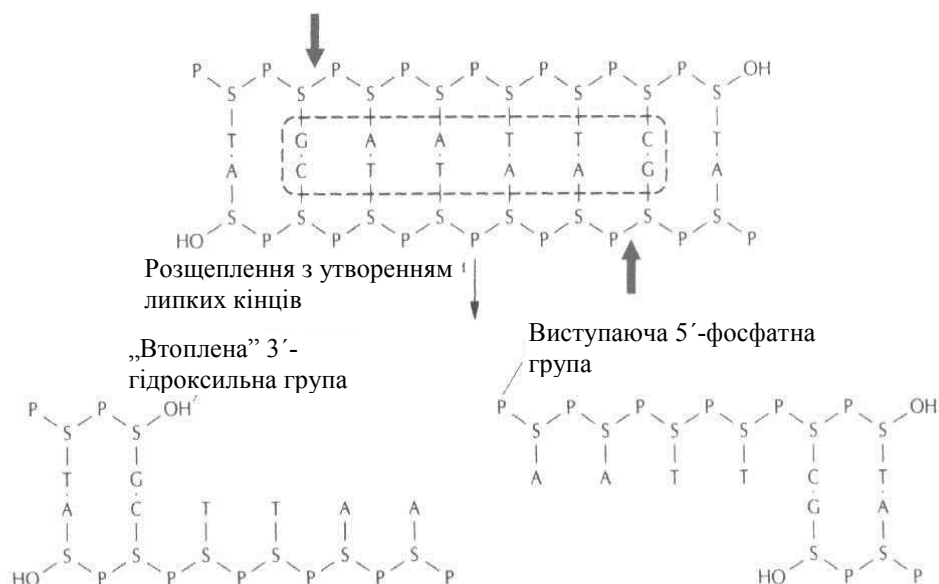


Рис. 1. Розщеплення короткого фрагмента ДНК ендонуклеазою рестрикції II типу EcoRI з утворенням липких кінців.

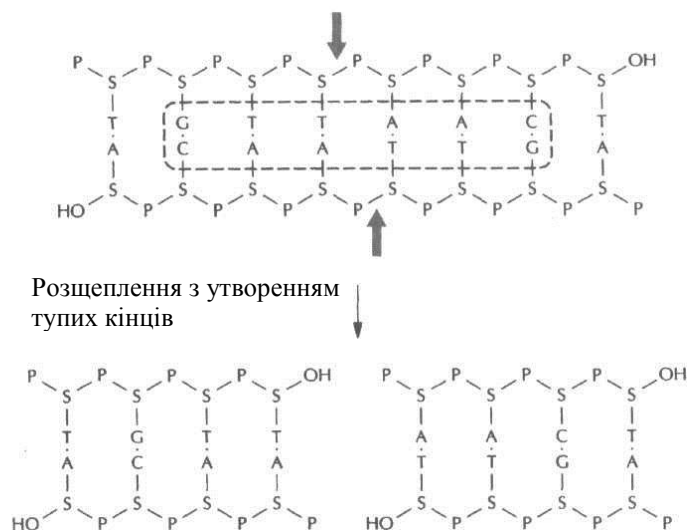


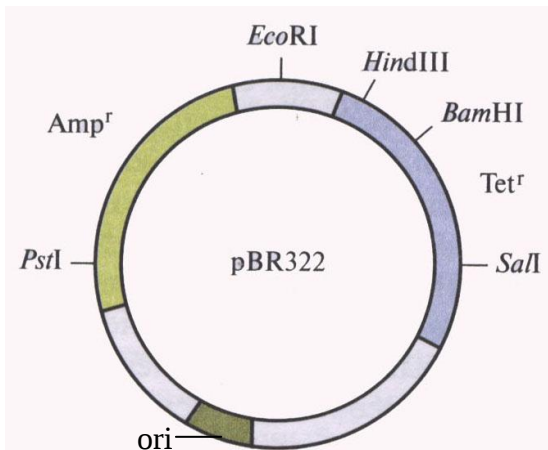
Рис. 2. Розщеплення короткого фрагмента ДНК ендонуклеазою рестрикції II типу HindIII з утворенням тупих кінців.

Таблиця 1

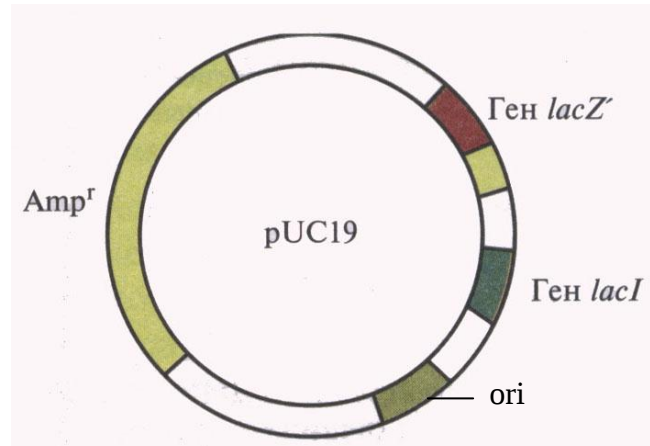
Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими ферментами рестрикції

Фермент	<i>Сайт впізнавання</i>	Характер утворюваних кінців
<i>EcoRI</i>	G↓A-A-T-T-C C-T-T-A-A↑G	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>BamHI</i>	G↓G-A-T-C-C C-C-T-A-G↑G	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>PstI</i>	C-T-G-C-A↓G G↑A-C-G-T-C	Виступаючі кінці із 3'-гидроксильною групою
<i>Sau3AI</i>	↓G-A-T-C C-T-A-G↑	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>PvuII</i>	C-A-G↓C-T-G G-T-C↑G-A-G	Тупі кінці
<i>HpaI</i>	G-T-T↓A-A-C C-A-A↑T-T-C	Тупі кінці
<i>HaeIII</i>	G-G↓C-C C-C↑G-G	Тупі кінці
<i>NotI</i>	G↓C-G-G-C-C-G-C C-G-C-C-G-G-C↑G	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою

Генетичні карти плазмідних векторів

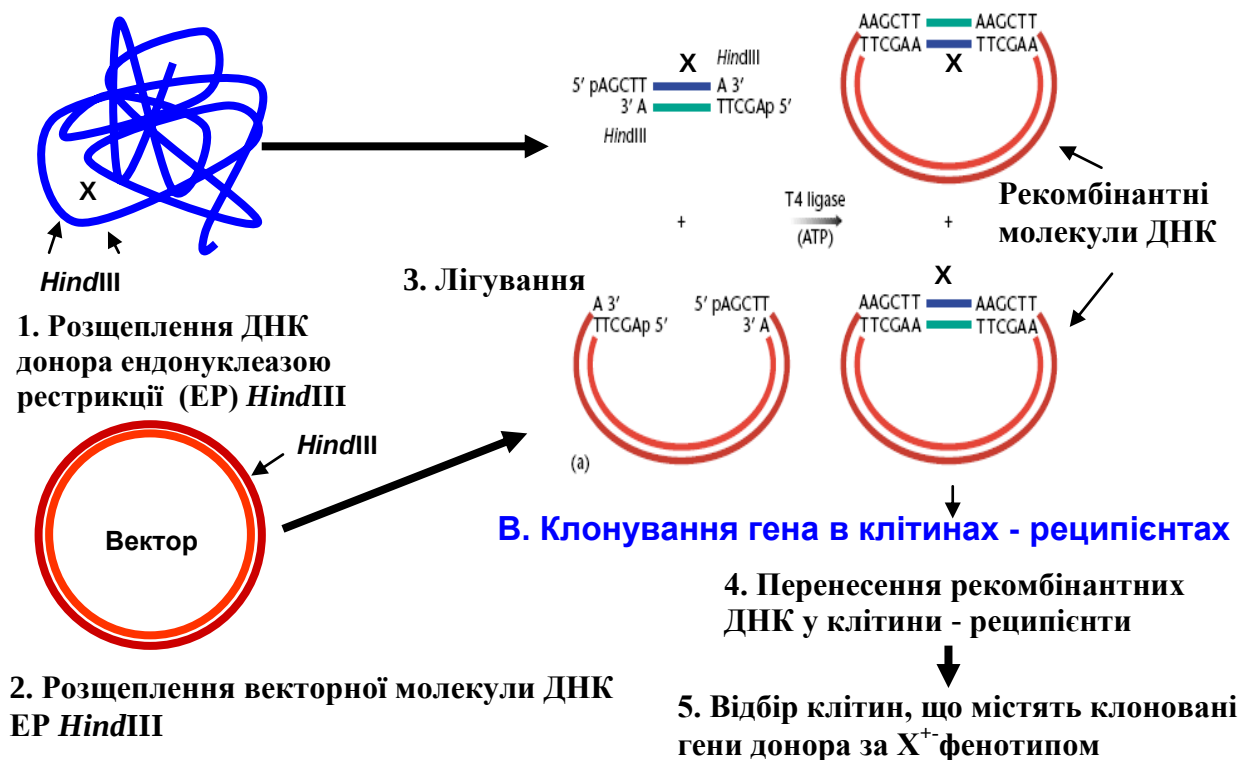


Генетична карта плазмідного вектора pBR322: Amp^r і Tet^r – гени ампіцилін і тетрациклін-резистентності відповідно; $PstI$, $EcoRI$, $HindIII$, $BamHI$, $SalI$ – сайти рестрикції відповідних рестриктаз; ori – точка початку реплікації.

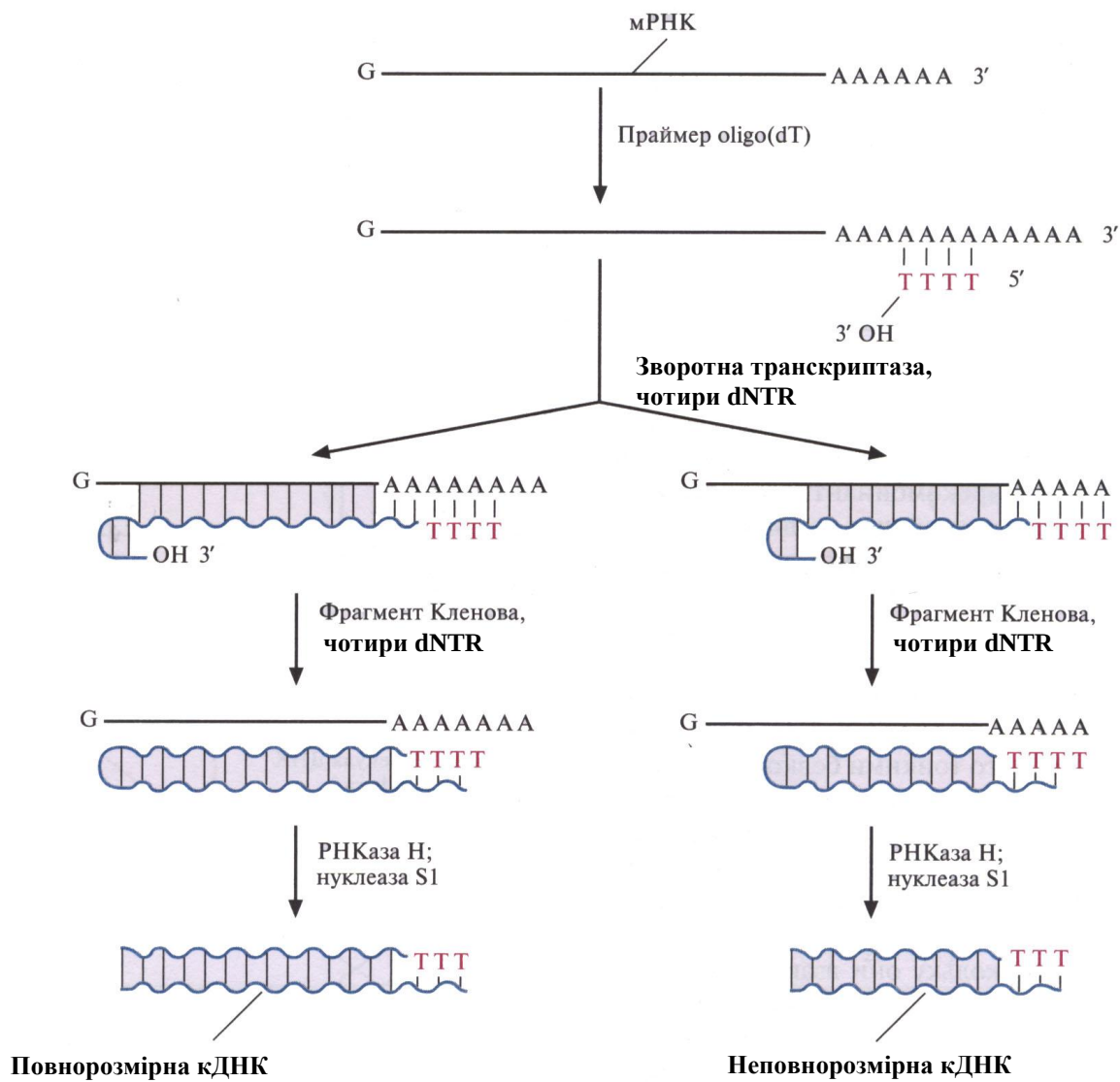


Генетична карта плазмідного вектора pUC19: Amp^r – ген ампіцилін-резистентності; ген $lacZ'$ – регульований сегмент гена β -галактозидази ($lacZ'$) лактозного оперона *E.coli*; ген $lacI$ – ген, який кодує репресор, що контролює експресію $lacZ'$.

Основні етапи генно-інженерного експерименту



Синтез кДНК



Вбудовування чужорідної ДНК у плазмідний вектор

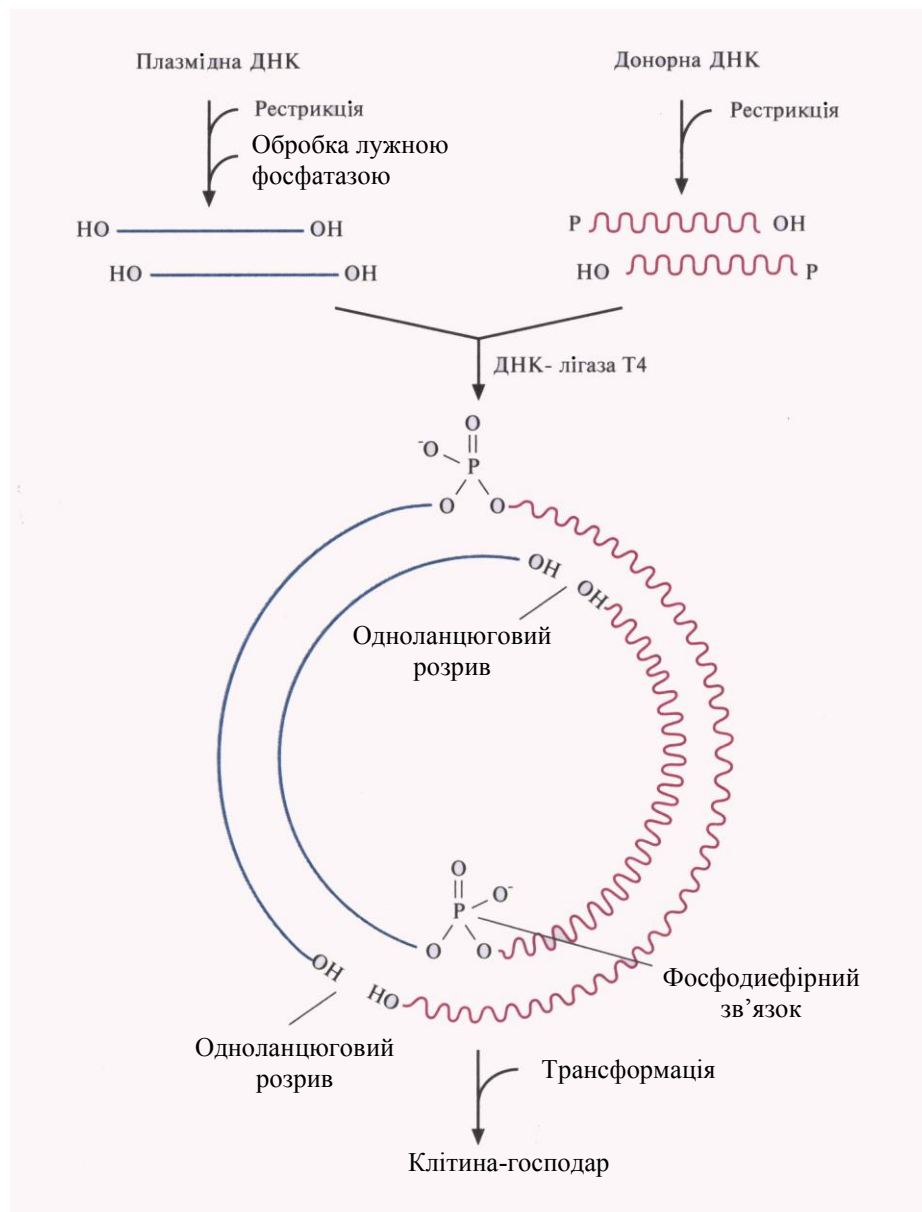


Схема клонування на основі бактеріофага λ

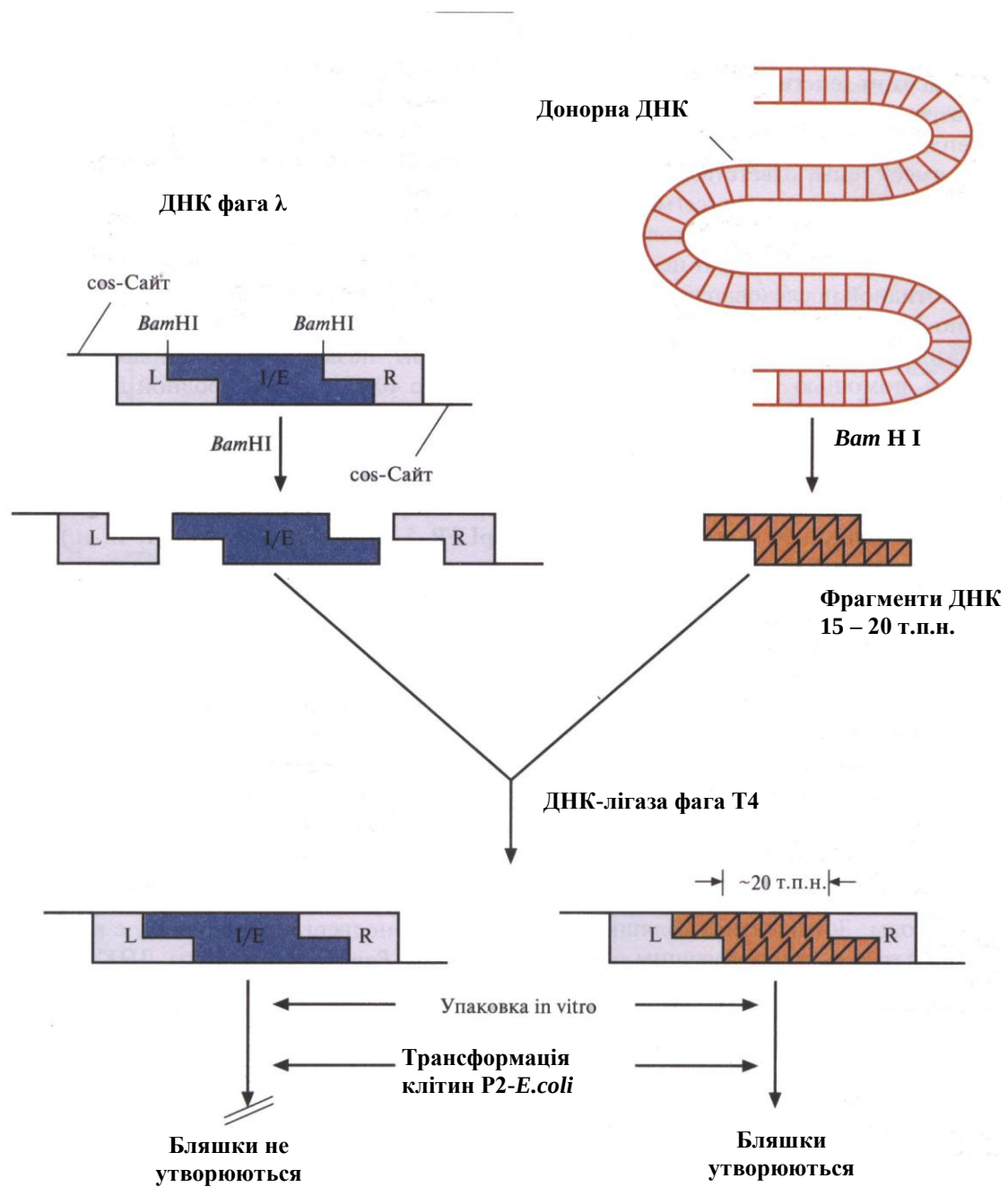


Схема клонування за допомогою космідного вектора

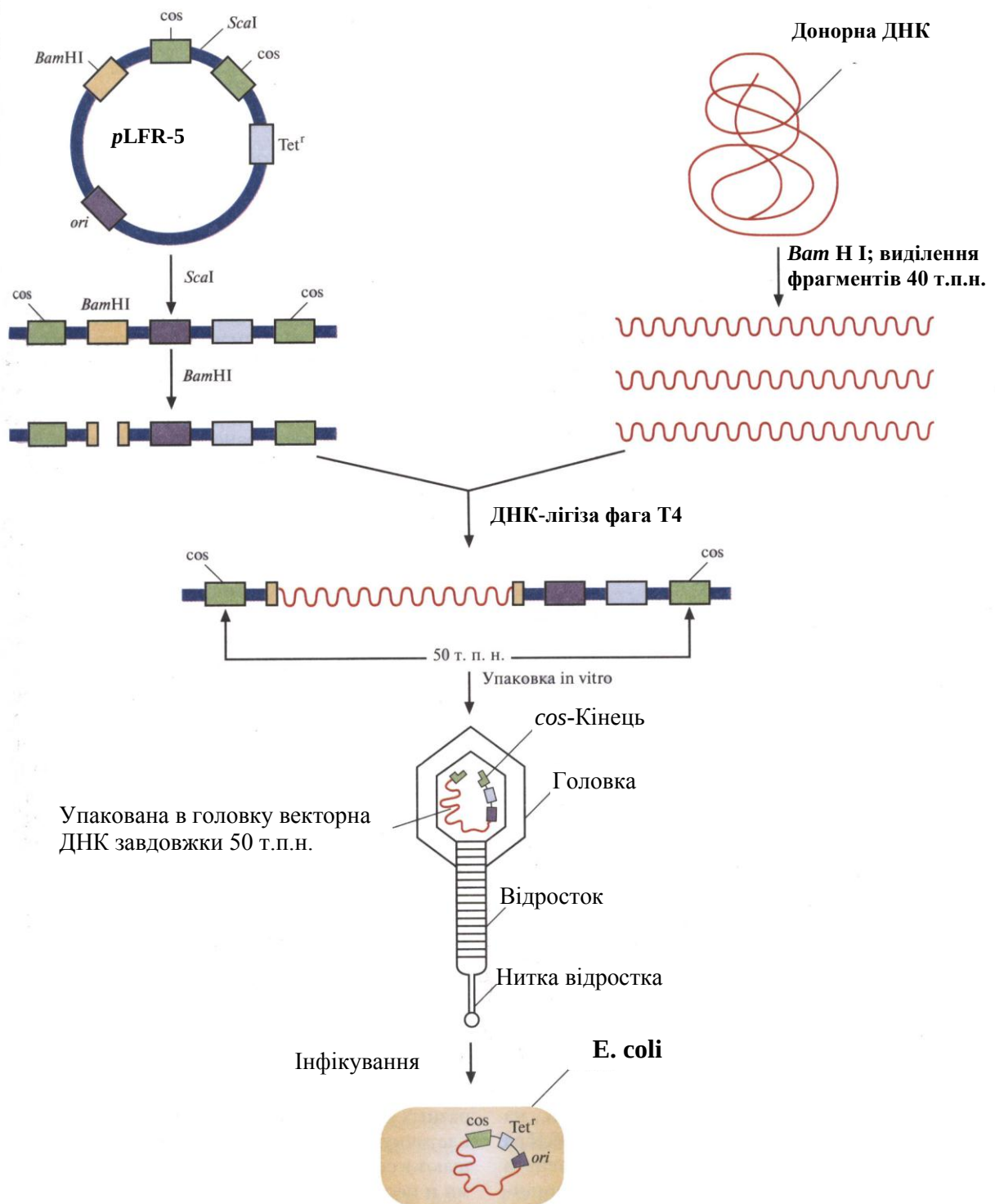
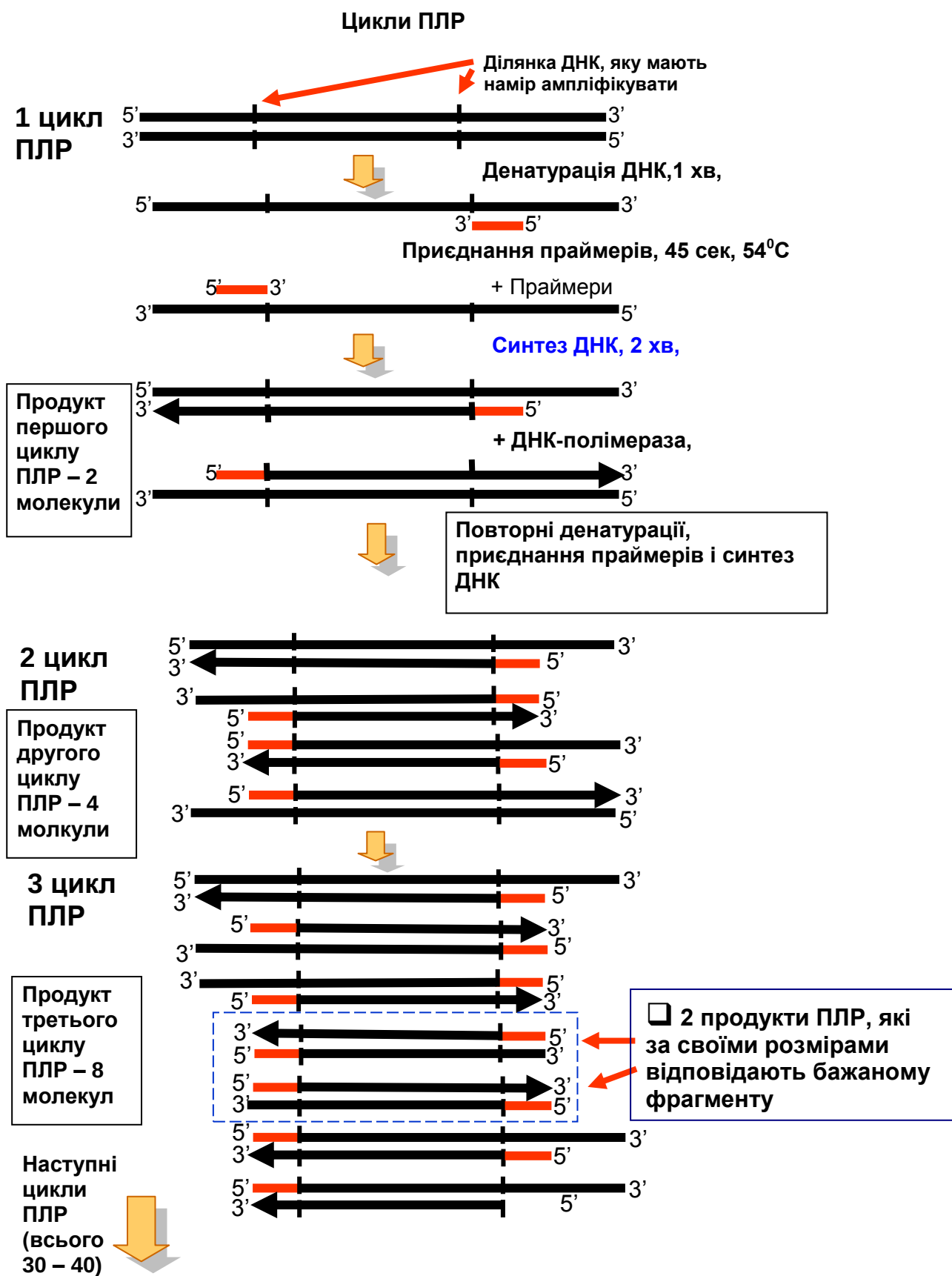


Схема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)



Принципова схема біосенсора

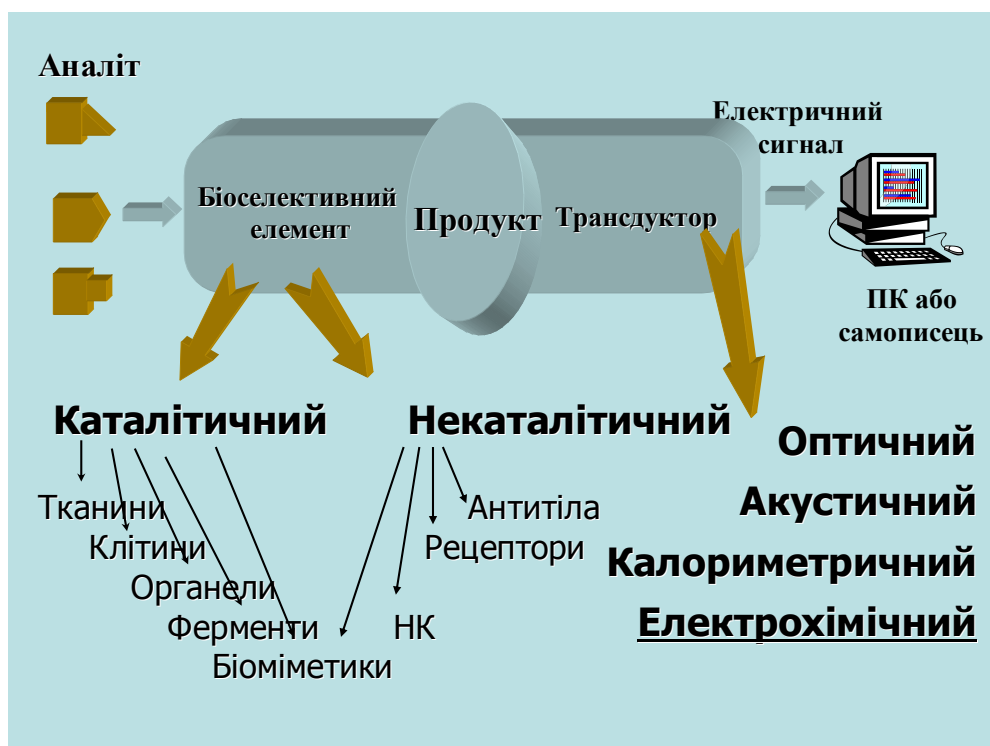


Схема амперометричних біосенсорів на основі O_2 - і H_2O_2 -селективних електродів

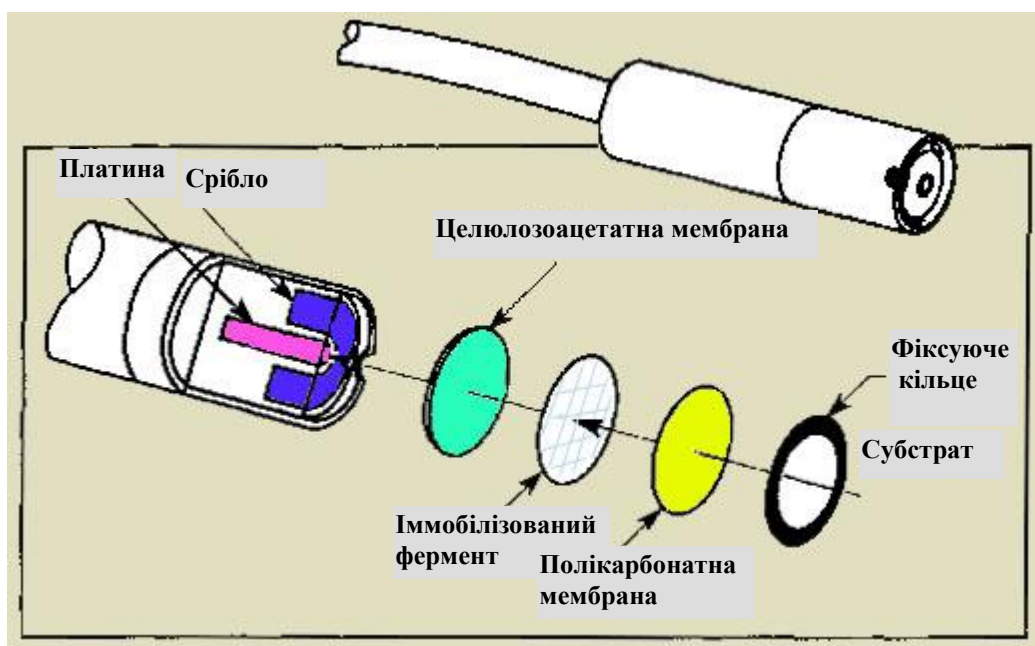
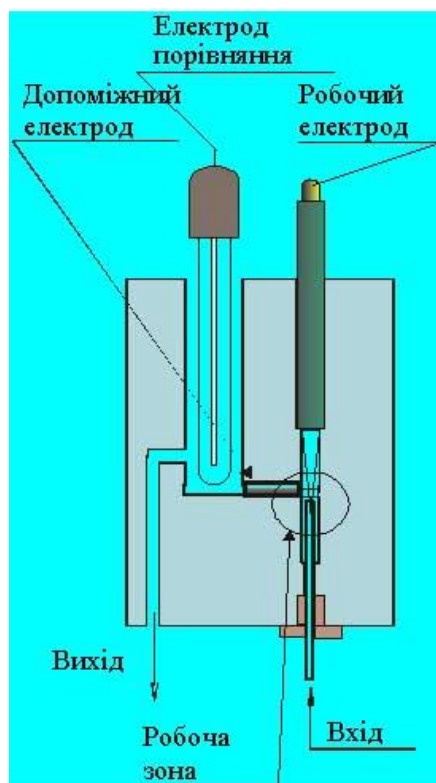
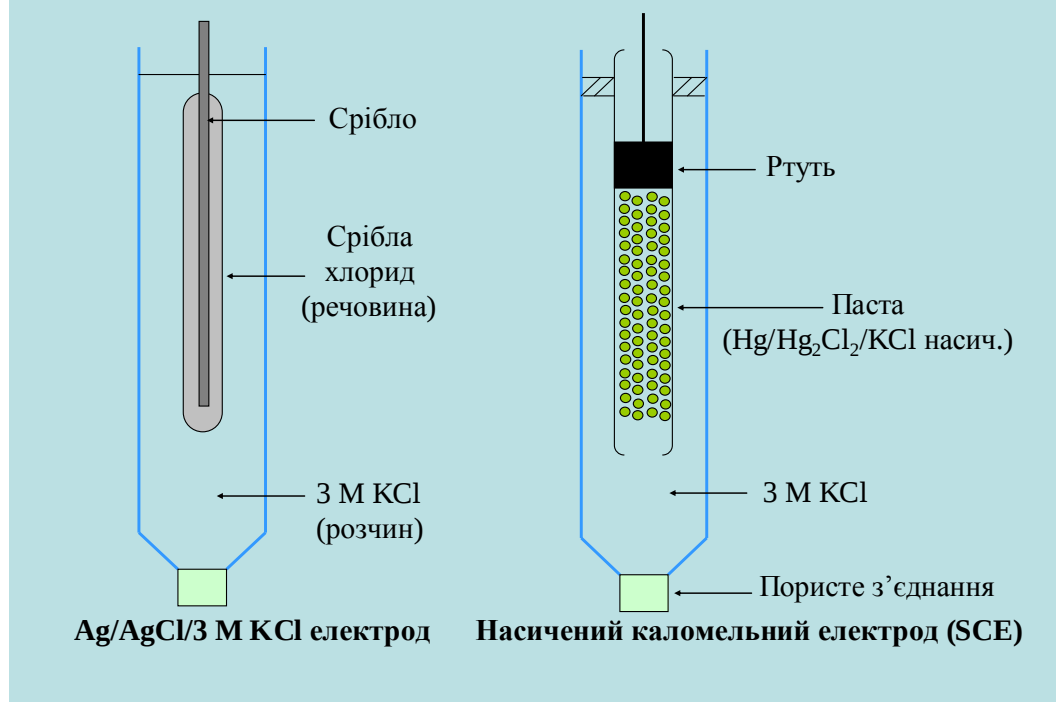


Схема трьохелектродного біосенсора



Типи електродів порівняння



ЗМІСТ

Вступ.....	3
Практичне заняття № 1. Промислові мікроорганізми. Основи культивування промислових культур мікроорганізмів.....	6
Практичне заняття № 2. Біотехнологія продуктів бродіння та білка одноклітинних.....	14
Практичне заняття № 3. Мікробіологічний синтез амінокислот.....	20
Практичне заняття № 4. Біотехнологія полісахаридів та ліпідів.....	25
Практичне заняття № 5. Біотехнологія антибіотиків.....	29
Практичне заняття № 6. Біотехнологія бактерійних добрив, засобів захисту рослин, мікробної біомаси.....	33
Практичне заняття № 7. Інженерна ензимологія.....	37
Практичне заняття № 8. Генно-інженерні методи конструювання промислових штамів мікроорганізмів.....	43
Практичне заняття № 9. Генно-інженерні методи конструювання вищих організмів.....	48
Практичне заняття № 10. Методи клітинної інженерії.....	53
Завдання підвищеної складності.....	59
Відповіді до завдань.....	61
Словник основних термінів і понять.....	62
Додатки.....	78

Навчальне видання

Галина Клепач

БІОТЕХНОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Для фахівців першого (бакалаврського) рівня вищої освіти галузі знань 0401 “Природничі науки” за напрямом підготовки 6.04.0102 “Біологія”

Видавничий відділ

Дрогобицького державного педагогічного університету

імені Івана Франка

Головний редактор

Ірина Невмержицька

Редактор

Ніна Хом'як

Технічний редактор

Наталя Кізима

Коректор

Оксана Бульбах

Здано до набору 29.12.2015 р. Підписано до друку 18.02.2016 р. Формат 60х90/16. Папір офсетний. Гарнітура Times. Наклад 300 прим. Ум. друк. арк. 6.02. Зам. 16.

Видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 2155 від 12. 04. 2005 р.) 82100, Дрогобич, вул. І.Франка, 24, к.42, тел. 2 – 23 – 78.