

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Львівський національний університет ветеринарної
медицини та біотехнології імені С.З.Гжицького

*кафедра біотехнології
та радіології*

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

*для самостійного вивчення дисципліни “Біотехнологія”
студентами заочної форми навчання за освітньою програмою
“Технологія виробництва і переробки продукції
тваринництва”*

ЛЬВІВ - 2025

Методичні вказівки для самостійного вивчення дисципліни “Біотехнологія” студентами заочної форми навчання за освітньою програмою “Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва” розроблено на основі освітньої та робочої програм, затверджено на засіданні кафедри, протокол №22 від 25.02.2025 року та засіданні навчально-методичної комісії спеціальності 204 “Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва” факультету біолого-технологічний, протокол № 6 від 28.02.2025 року.

Укладачі: д.с.-г.н., професор Буцяк В.І., асистент Кіт Н.П.

Рецензенти: завідувач кафедри годівлі тварин та технології кормів, доктор с.-г. наук, професор Півторак Я.І.

© Буцяк Василь Іванович, Кіт Н.П., 2025

Передмова

Методичні вказівки щодо вивчення дисципліни “Біотехнологія”, складені для студентів заочної форми освіти, які дозволять поглибити знання з молекулярної біології, клітинної і генетичної інженерії, а також біотехнології біологічно активних речовин. Сформована біля 40 років тому біотехнологія досягла високого рівня розвитку і є загально визнаною у прискоренні науково-технічного прогресу, вона дозволяє успішно вирішувати багато питань, які донедавна були вузьким місцем у галузі медицини, ветеринарної медицини, сільського господарства, харчової промисловості та екології.

Використання біотехнології у навчальному процесі, наукових дослідженнях і сфері виробничої діяльності дає змогу забезпечити вирішення багатьох практичних питань охорони здоров'я, продовольчої програми, створення високорентабельних безвідходних виробництв джерел енергії, одержання екологічно безпечної продукції рослинництва і тваринництва.

Одним з конкретних кроків, направлених на реалізацію можливостей біотехнології стало затвердження учбових програм вищих аграрних вузів України з біотехнології. Необхідність у біотехнологічній підготовці випливає з того, що уже сьогодні здійснюється комерційно-бізнесове виробництво таких біологічно активних речовин, як інтерферонів, інсуліну, гормону росту, вакцин, ферментів, створено штами мікроорганізмів-суперпродуцентів амінокислот, вітамінів, антибіотиків.

Біотехнологічний принцип лежить в основі біоконверсії відходів сільськогосподарського виробництва і одержання біогазу та цінного органічного добрива. Предметом біотехнології є наукові розробки з іммобілізації ферментів та інших біологічно активних речовин на органічних та мінеральних носіях з наступним використанням у тваринництві, рослинництві, ветеринарній медицині і переробній промисловості. Ці та інші приклади свідчать про необхідність набуття біотехнологічних знань спеціалістами і працівниками в сільськогосподарській сфері та суміжних галузях.

РОЗДІЛ 1

Теоритичні основи дисципліни “Біотехнологія”

Біотехнологія – галузь фундаментальних і прикладних знань, яка займається дослідженнями використання біологічних процесів у виробництві, сільському господарстві та техніці. Це один із пріоритетних напрямків, які забезпечують прискорення науково-технічного прогресу. Біотехнологічні процеси використовувались людством із давніх часів для одержання одягу (вичинення шкіри), продуктів харчування (квашення, сироваріння) та напоїв (вино, квас, пиво). Однак наукові передумови розвитку біотехнології виникли в 40-60-х роках ХХ століття на основі досягнень біохімії, мікробіології, ензимології, вірусології, генетики, молекулярної біології. Як окрема галузь біологічної науки, біотехнологія сформувалась у 70-80-х роках ХХ ст. У наш час найінтенсивніше розвиваються галузі біотехнології пов’язані з використанням біосинтезу, в першу чергу мікробіологічного, наприклад для одержання тваринного білка.

Методами клітинної і генетичної інженерії створено мікроорганізми, що швидко нагромаджуються біомасу, а також різні біологічно активні речовини. На базі біотехнологій розроблено виробництво інсуліну. Великі можливості біотехнології є у виробництві ферментів, амінокислот, поліцукридів тощо. Важливою галуззю біотехнології є розробка ефективних промислових технологій для одержання у великих кількостях корисних організмів, наприклад ентомофагів, які використовуються для біологічної боротьби з шкідниками. Дальший розвиток біотехнології пов’язаний із застосуванням автоматизованих систем контролю і керування біотехнологічними процесами.

Методи біотехнології використовують також для захисту матеріалів та споруд від біопшкоджень, при бактеріальному добуванні міді, при переробці промислових і побутових відходів, при біотехнології одержання біогазу тощо.

За структурою біотехнологія поділяється на загальну і прикладну. До загальної біотехнології відноситься клітинна та генетична інженерія. До прикладної біотехнології відносяться іммобілізація ферментів, одержання вітамінів, гормонів, ферментів і різних лікарських препаратів, трансплантація органів і ембріонів, питання екологічного плану, які стосуються утилізації відходів сільськогосподарського виробництва.

Клітинна інженерія

Клітинна інженерія – один з напрямків біотехнології, який займається конструюванням клітин нового типу на основі гібридизації (штучного об'єднання клітин з утворенням гібридизованого геному), реконструкції (створення нових клітин з певних фрагментів) та культивування клітинних культур. Методи клітинної інженерії дають можливість з'єднувати геноми досить віддалених видів рослинних і тваринних організмів. Це призводить до створення нових форм з новими цінними властивостями, для яких характерні корисні ознаки та стійкість до захворювання.

Усі живі істоти, що населяють Землю, окрім вірусів і фагів складаються з клітин. Ріст, розмноження, обмін речовин, подразливість та інші прояви життєдіяльності організму відбувається внаслідок утворення нових клітин. Клітини – це структурна і функціональна одиниця живого організму. Розрізняють клітин еукаріот (еукаріотичні клітини) та прокаріот (прокаріотичні клітини). Тварини, вищі рослини та гриби складаються з еукаріотичних клітин.

Еукаріотичні клітини, тобто ядерні, відрізняються від прокаріотичних (безядерних) істотними структурними особливостями. Основною відмінністю цих клітин є те, що в еукаріотичних клітин є ядро де зосереджена ДНК, яка відокремлена від цитоплазми ядерною мембраною, а у прокаріотичних клітинах генетичний матеріал не ізольований від цитоплазми, тобто немає сформованого ядра.

В еукаріотичних клітинах розрізняють метаболічний зв'язок клітини з навколишнім середовищем і складається з плазматичної мембрани, надмембранного комплексу (глікокаліксу) та субмембранних опорно-скоротливих структур гіалоплазми. Метаболічний апарат включає органели (ендоплазматична сітка, мітохондрії, комплекс Гольджі, рибосоми тощо), що забезпечують усі метаболічні процеси клітини.

Життєвий цикл клітини від одного ділення до наступного або її смерті називається клітинним циклом. У безперервно розтучих організмів клітинний цикл співпадає з мітотичним циклом і складається з 4-х періодів (три перші відносяться до інтерфази) з чітко вираженою послідовністю зміни один одного та мітозу. Тривалість життєвого циклу клітин різного типу дуже змінюється. Так, інтерфаза епітеліальних клітин продовжується кілька днів, а у нервових – усе життя.

При культивуванні клітин проводять синхронізацію клітинного циклу за допомогою мітогенів. Культура клітин – вирощування окремих

клітин або групи клітин на твердих, або рідких середовищах. При цьому використовують клітини багатоклітинного організму, які живуть та розмножуються в штучних умовах поза організмом, що забезпечується за рахунок створення відповідного живлення, газообміну, виділення тощо.

Однією із основних властивостей культури клітин є обмежена тривалість життя (50-100 поділів). Чим молодший вік джерела з якого добуто клітини, тим більшу кількість разів вони здатні ділитися, перш ніж загинуть. Розрізняють наступні культури клітин:

1. Первинні культури – одержують практично з будь-якого органу. Моношар культури формується за 3-5 днів, який зберігає життєздатність від 7 до 21 доби.

2. Диплоїдні – одержують з ембріональних тканин, в яких довший час зберігаються вихідні біологічні властивості, в тому числі й постійний диплоїдний набір хромосом.

3. Перещеплені (стабільні) – лінії, які можуть існувати поза організмом довгий час (десятки років). Одержують шляхом пересівання.

Одним з напрямків клітинної інженерії є клонування клітин. Клонування – набір методів та прийомів, які застосовують для виділення і розмноження нестатевим шляхом клітин або організмів, які є точною копією спільного предка. Всі особи одного клону схожі з материнським організмом, відрізняються більшою генетичною спорідненістю, ніж особини, що утворились внаслідок статевого розмноження.

Істинні клони хребетних тварин (амфібій) були отримані шляхом пересадки ядер соматичних клітин в енукейовані яйцеклітини (безядерні). Дж. Гордсном у 1961 р., Прасером у 1977 р. було проведено пересадку ядер із бластомерів в енукейовані яйцеклітини корів. Таким чином, в дослідях на вівцях і коровах показано, що ядра із ембріонів, які діляться на ранніх стадіях розвитку можуть бути використані при утворенні клонованих тварин.

Злиття двох типів нестатевих клітин, у тому числі і таких, що належать до різних видів, з утворенням гетерокаріону (комбіновані клітини з двома ядрами) – називається гібридною клітиною. Для утворення гібридних клітин використовували інактивованій вірус Сендай, поліетеленгліколь, або електричний розряд. Гібриди, які утворилися, володіють меншою здатністю до росту і розмноження порівняно з нормальними клітинами. Щоб попередити це явище, використовують так звані селективні середовища. Суть цих середовищ наступна. Для гібридизації підбирають клітини, які мають певні генетичні дефекти, але важливо, щоб вони були різними у батьківських клітинах. У селективному середовищі дефектні

клітини рости не можуть, але при злитті клітин, тобто у гібридній клітині обидва дефекти компенсуються за рахунок партнера. В результаті гібридна клітина розвивається нормально, а батьківські клітини гинуть.

Особливу групу гібридних клітин складають гібридоми. Саме слово гібридома свідчить, що одним із її батьків була пухлинна клітина. Гібридома це клітинний гібрид, одержаний при злитті нормальної антитіло утворюючої клітини (лімфоцита) і пухлинної клітини мієломи. Вона володіє здатністю синтезувати моноклональні антитіла бажаної специфічності (властивість лімфоцита) і до необмеженого росту (властивість пухлинної клітини), що забезпечує гібридомам “безсмертя”. Моноклональні антитіла – однакові за структурою і специфічністю імуноглобуліни, біосинтез яких здійснюють клоновані гібридоми.

Основні переваги моноклональних антитіл обумовлені специфічністю до однієї антигенної детермінації, що підвищує лікувальні властивості. Вони використовуються у діагностичних цілях, зокрема в імуноферментному, радіобіологічному методах; при проведенні трансплантації органів з їх допомогою визначають сумісність тканин; широко використовуються у фармацевтичній промисловості для одержання та очистки ліків.

У даний час один із перспективних напрямків біотехнології є штучне одержання химер (мозаїчних тварин). У химерних тварин різні групи клітин походять не від однієї, а від кількох зигот. Розрізняють первинний химеризм, коли різні клітинні популяції співіснують з моменту запліднення або раннього ембріогенезу, і вторинний, за якого комбінуються тканини від двох і більше дорослих особин або ембріонів після початку глибокої клітинної диференціації.

Суть такого біотехнологічного методу, заснованого на досягненнях клітинної інженерії і мікроманіпуляціях на ранніх ембріонах, зводиться до штучного об’єднання ембріональних клітин двох і більше тварин, що відносяться не лише до однієї породи, але й до різних порід і навіть видів. Отримані тварини – химери несуть ознаки різних генотипів. Усі до цих пір відомі експериментальні химери ссавців отримані методами агрегації двох і більше генотипово різних зародків або шляхом мікроін’єкції клітин внутрішньоклітинної маси бластоцисти донорів у бластоцель ембріона-реципієнта.

Результати дослідження в галузі клітинної інженерії широко застосовуються у народному господарстві, дають змогу розв’язати як теоретичні проблеми біології, так й практичні завдання в галузі тваринництва, рослинництва та медицини.

Генетична інженерія

Генетична інженерія – це розділ біотехнології, що базується на розробці методів спрямованого синтезу нових, таких, що не існують в природі, поєднань генів (рекомбінованих ДНК), які розмножуються в клітині і синтезують кінцеві продукти обміну. Народження генетичної інженерії прийнято датувати 1972 роком, коли П. Берг сконструював першу гібридну (рекомбіновану) ДНК на основі досягнень молекулярної генетики та молекулярної біології.

У формуванні генетичної інженерії важливу роль відіграла генетика мікрорганізмів, що виникла у 40-х роках минулого століття, де як генетичних об'єктів використовувалися гриби, пізніше бактерії і фаги. Найбільш вдалим виявився штам *K-12 E.coli*, оскільки ця бактеріальна культура містила, як виявилось пізніше, профаг λ , майбутній класичний об'єкт генетичної інженерії.

Оскільки ген – це певний відрізок нуклеотидної послідовності ДНК, який несе інформацію про той чи інший білок, то, звичайно, в центрі уваги генетичної інженерії лежить молекула ДНК. У 1953 році Уотсон і Крік відкрили хімічну структуру ДНК, яка виявилася біспіральною і її ланцюги комплементарні. Це відкриття зумовило досить швидко розкрити механізм передачі генетичної (спадкової) інформації: в ході реплікації (подвоєння) ланцюги ДНК розплітаються і на кожному з них добудовується комплементарний новий полінуклеотидний ланцюг. Попередній ланцюг служить матрицею для синтезу нового. Так подвоюється спадкова інформація в клітинах живих організмів.

Послідовність азотистих основ відповідає первинній структурі ДНК одного ланцюга. Функціонально такий ланцюг розділений на велике число відрізків, що відповідають окремим генам. У найпростішій схемі генетична інформація, закодована нуклеотидами ДНК, реалізується таким чином: ген $\rightarrow$ фермент $\rightarrow$ білок. Первинна структура білка визначається чергуванням амінокислот у поліпептиді, яке реалізується через генетичний код для кожної амінокислоти. Генетичний код є нуклеотидний триплет, названий кодоном.

Всі гени класифікуються на структурні і регуляторні. До структурних генів відносяться ті послідовності ДНК, які кодують безпосередньо білкову структуру, а регуляторні – регулюють активність структурних генів. Сукупність суміжних структурних генів з рядом розташованих груп регуляторних генів складає одиницю генетичної регуляції або оперон.

Гени прокаріот складаються з промотора (послідовності нуклеотидних пар, які пізнає РНК-полімераза), білоккодуєчої ділянки, або структурної частини і термінатора транскрипції (послідовність нуклеотидних пар, яка припиняє дію РНК-полімерази).

В еукаріот більшість сегментів ДНК, як окремі гени, мають складну будову: чергуються, кодуєчі та некодуєчі ділянки гена. Це екзони, які кодуєють специфічний для даного гена білок, як, наприклад, поліпептид, рРНК, тРНК та інтрони, не кодуєчі тобто не містять генетичної інформації. На відміну від генів прокаріот, гени кодуєчі білки еукаріот не об'єднані в оперони, тому вони мають власні промотори і термінатори. Для реалізації транскрипції (переписування генетичної інформації ДНК у вигляді комплементарних полінуклеотидних ланцюгів РНК) у клітинах еукаріот є три різні РНК-полімерази, що здійснюють синтез мРНК, рРНК і тРНК.

Транскрипція генів еукаріот відбувається у ядрі клітини. Синтезована мРНК-попередник, або пре-мРНК (містить екзони і інтрони в структурній частині) піддається процесу дозрівання – некодуєчі білок ділянки вирізаються а кодуєчі, навпаки, зливаються. Сукупність структурних змін у початковому процесі транскрипції генів еукаріот, в результаті яких ядерна мРНК перетворюється в зрілу молекулу мРНК (іРНК), в молекулярній генетиці і молекулярній біології називають сплайсингом.

Генетична інженерія використовує певні принципи і засоби, що базуються на основних її завданнях – ідентифікації та виділення генів з якими, проводиться маніпулювання *in vitro*, створення рекомбінованих (гібридних) ДНК, клонування і експресія гібридного продукту. Для цього використовують цілий набір ферментів головні з яких є рестриктази, ДНК-полімерази, лігази, ревертази.

У даний час відомо понад 400 рестриктаз. Вони є дезоксирибонуклеазами, що розщеплюють ДНК на довгі чи короткі відрізки і навіть на окремі нуклеотиди. Рестриктази здатні пізнавати короткі нуклеотидні послідовності із 4-6 нуклеотидних пар (сайти пізнання) і розрізати міжнуклеотидні зв'язки тільки у чітко визначених ділянках молекули ДНК (рестриктах). Використовуючи відповідний набір рестриктаз можна здійснити нарізання певних частин (генів) ДНК як для їх одержання та реалізації у генетичній інженерії.

Реплікація ДНК відбувається за принципом комплементарності відповідних азотистих основ і матричного способу синтезу дочірної ДНК. Реплікаційний процес починається з відповідної ділянки дволанцюгової молекули ДНК і проходить одночасно в двох

ланцюгах, які поступово розплітаються. Дочірні ланцюги синтезуються під дією ДНК-полімераз в напрямку від 5' атома пентози до 3' атома фосфорної кислоти.

Рестриктази гідролізують молекули ДНК на фрагменти у вигляді лінійних чи циклічних структур. Створені розриви фосфодіефірних зв'язків можна репарувати по місцях “липких” кінців ДНК між собою. Ферменти, що здатні лігувати (зшивати) в єдині структурні сегменти ДНК, утворені рестриктазами, одержали назву лігаз. Лігази в клітинах беруть участь як в синтезі ДНК, так й при її репарації, тобто відновленні нормальної структури після часткового пошкодження генетичного апарату.

В онкогенних вірусах виявлено фермент зворотної транскрипції. За допомогою цього ферменту в клітинах може проходити синтез ДНК на РНК, тобто генетична інформація йде від мРНК до ДНК. Відкриття зворотної транскриптази відіграло принципово важливу роль для вирішення вузлових питань сучасної молекулярної генетики і знайшло застосування в генетичній інженерії як інструмент при синтезі кДНК, що необхідна для клонування та при одержанні гібридизаційних зондів, тобто часткових копій генів.

Для введення чужорідної генетичної інформації і забезпечення ампліфікації та інтеграції у геном використовуються спеціальні вектори. Це молекули ДНК, які здатні до позахромосомної реплікації і мають ділянки клонування для введення в реципієнтну клітину чужорідної ДНК. У генетичній інженерії застосовують як вектори плазміди, бактеріофаг λ , ниткоподібні фаги та косміди.

Плазміди бактерій – це молекули ДНК від 2250 до 400000 пар нуклеотидів. У просторовому аспекті плазміди – кільцеві молекули ДНК, що локалізовані в цитоплазмі і характеризуються різними функціями. На основі функціональних властивостей плазміди поділяються на фактори генетичного переносу, фактори стійкості бактерій до лікарських препаратів і коліціногени.

Фактори генетичного переносу – це не що інше як статевий фактор обумовлюючий при кон'югації перенос генів. Бактерії, що містять ці плазміди служать генетичними донорами. Фактори стійкості до лікарських речовин контролюють синтез ферментів, які надають бактеріям стійкості до антибіотиків, сульфаніламідних препаратів. Коліціногенний фактор містить гени, які кодують синтез особливих білкових речовин – коліцинів. Дія коліцинів характеризується різними механізмами від бактеріоцидної дії, шляхом інгібування процесів

окиснювального фосфорилування, до гідролізу ДНК та деградації рРНК.

Найбільш досконало вивчений і набув використання в процесі генетичної трансдукції, тобто переносу генетичного матеріалу фаг λ . Молекула його ДНК має лінійну форму і складає до 48500 нуклеотидних пар. На кінцях є одноланцюгові коплементарні ділянки із 12 нуклеотидних залишків – сайтів, які забезпечують перетворення молекули ДНК в кільцеву. Фагові вектори мають ряд переваг, їх ємкість обмежена і це не дозволяє проводити селекцію рекомбінованих ДНК безпосередньо за молекулярною масою.

Для клонування великих фрагментів ДНК і конструювання геномних бібліотек як вектори використовують косміди. Вони суміщають позитивні властивості плазмід і фагів, володіють здатністю тривалий час автономно реплікуватися. Одержані на основі одноланцюгових бактеріофагів, їх перевага в тому, що ДНК, виділена із рекомбінованих фагових частин, одноланцюгова і може використовуватися як матриця при секвенуванні ДНК методом Сенгера. Наприклад, циркулярна ДНК фагу *M 13* має біля 6500 нуклеотидів, із яких 507 є не суттєвими для реплікації вірусу. Тому вставка в цю зону чужорідної ДНК практично не впливає на життєздатність фагу.

До операцій, які домінують в методології генетичної інженерії відносяться наступні:

1. Виділення генів із геному донора або їх синтез.

2. Технологія рекомбінованих (гібридних) молекул ДНК та їх клонування.

3. Експресія клонованих генів в реципієнтних клітинах.

Існує три джерела для одержання молекул ДНК (генів), що використовуються в генетичній інженерії. Це фрагменти генетичного матеріалу різних організмів; хімічний, вірніше, хімічно-ферментативний синтез генів; і дволанцюгові ДНК, одержані на основі одноланцюгової ДНК-коплементарної-мРНК еукаріотичних організмів (кДНК). Виділення окремих генів із природного генетичного матеріалу здійснюється шляхом видалення із клітини чи організму ДНК, її фрагментація та ідентифікація генетичної інформації в одержаних фрагментах.

У 1967 році Корнберг і Джуліан провели штучний синтез генетичної речовини вірусу інфекційної ДНК. Як матрицю використали кільцеву одноланцюгову нитку фагу *X 174*. У присутності ДНК-полімерази із чотирьох рибонуклеотидтрифосфатів синтезували РНК, яка при додачі

її в культуру *E. coli* викликала зараження, розвиток, і розмноження того фагу, звідки була виділена матриця. В подальшому Кораною вдосконалювалися методи синтезу генів і це відкрило шлях для виробництва продуктів білкової природи шляхом введення в клітини мікроорганізмів штучно синтезованих генів де вони експресуються в складі гібридних молекул ДНК. За допомогою цього методу були синтезовані соматотропін та інсулін. Метод включає велике число хімічних реакцій, є дорогий, складний і здійснити в промисловому масштабі виявилось досить важко.

Ці проблеми, були розв'язані після відкриття у 1970 році в онкогенних вірусах ферментів зворотної транскрипції – зворотних транскриптаз, які каталізують синтез ДНК на матриці РНК *in vitro*. Для цього синтезу окрім названих ферментів необхідні матриці – індивідуальні мРНК, затравки (найчастіше це оліго-аТ). На матриці РНК синтезується один ланцюг ДНК. РНК руйнується лугом, або специфічною РНК-азою. Синтезована ДНК є комплементарною мРНК. Другий ланцюг ДНК синтезується за участю ДНК-полімерази. Одержана дволанцюгова ДНК є копією мРНК і позначається кДНК.

Метод рекомбінації *in vitro* полягав у виділенні ДНК із різних організмів, чи синтез, одержання гібридних молекул ДНК і введення рекомбінованих молекул в живі клітини з тим, щоб добитися проявлення нової ознаки, наприклад синтезу специфічного білка. Для приєднання фрагмента чужорідної ДНК до клонуючого вектора необхідно здійснити реакцію взаємодії між кінцями фрагмента та вектора. Цей процес забезпечується шляхом створення кінцевих комплементарних послідовностей у фрагментах і векторах так, щоб при змішуванні вони змогли утворити гібридну ДНК.

Для цього використовують рестриктази, які утворюють ступінчасті розриви з короткими комплементарними одноланцюговими “липкими” кінцями. Є й інший метод, який використовує окрім рестриктаз термінальну трансферазу. Відомо, що ДНК-лігаза фагу T_4 здатна зживати “тупі” кінці. Зживання “тупих” кінців призводить до безпосереднього сполучення фрагментів, утворених при розщепленні ДНК рестриктазою, яка розрізає обидва ланцюги ДНК в одній точці. Метод особливо корисний тоді коли потрібно зшити дві визначені послідовності без вмонтовування між ними якого-небудь додаткового матеріалу.

Спосіб введення в клітину гібридних молекул ДНК залежить від вектора. Якщо як вектор використовується плазміда, то введення йде за

типом трансформації, якщо фаг λ – за типом трансфекції. Перенос може здійснюватися механізмом трансдукції за коньюгації клітин, який називається трансгенозом. Під трансгенозом розуміють перенос в еукаріотичні клітини чужорідних генів за допомогою неонкотичних вірусів та фагів, найчастіше фагу λ . Механізми експресії генів у прокариот досить добре вивчені та зрозумілі внаслідок багаторічних фундаментальних молекулярно-біологічних досліджень бактерії *E. coli* та деяких її фагів.

Першою умовою експресії чужорідного гена в мікроорганізмах є наявність перед цим геном сильного промотора, який добре пізнає РНК-полімеразу клітини-господаря. Високий рівень транскрипції може призвести до нестабільності плазмідної реплікації, якщо за активно транскрибуючим геном не розташовані сайти ефективності термінації транскрипції. Для практичних цілей вигідно використовувати регулюючу експресію оскільки не тільки суперсинтез РНК, але й особливо суперсинтез багатьох білків може виявитися згубним для клітини.

У генетичній інженерії часто використовують сильні промотори *E. coli* (лактозного оперону – *lac UV5*, триптофанового – *lac (trc-lac)*, промотори фагу λ - P_R і P_L деякі сильні промотори фагів T_5 , T_7).

Існує три способи конструювання, які забезпечують трансляцію чужорідної генетичної інформації у бактеріях. Перший спосіб – впровадження чужорідного структурного гена, позбавленого власних регуляторних ділянок, в середину добре експресуючого бактеріального гена. Точка вбудови повинна бути віддалена від місця ініціації трансляції, щоб нова нуклеотидна послідовність не заважала ефективній ініціації транскрипції і трансляції бактеріального гена.

Другий шлях – перетворення “гібридного сайту” зв’язуванням з рибосомами. У цьому випадку проводиться розщеплення в молекулі бактеріальної ДНК між послідовностями SD і кодоном ініціації. Чужорідний структурний ген несе власний кодон ініціації та декілька нуклеотидів перед ним. Об’єднання *in vitro* таких конструкцій дає гібридний сайт зав’язування з рибосомами. Перевага методу полягає в тому, що клітина синтезує нормальний повнорозмірний чужорідний білок.

Третій спосіб позбавлений недоліків перших двох і об’єднує їх переваги має назву методу гібридного оперону. В конструкції використовується принцип “перекривання” генів (*overlapping*), виявлений у бактерій та фагів. У цих випадках термінуючий кодон проксимального до промотора гена є одночасно частиною ініціюючого кодону

дистального гена оперону При цьому SD-послідовність другого гена розташована безпосередньо в кодуєчій ділянці першого.

Одержання штамів – суперпродуцентів чужорідного білка не закінчується конструюванням гібридних молекул ДНК, в яких чужорідний ген має ефективні сайти ініціації, транскрипції і трансляції. Для одержання високого виходу білка важливим є забезпечення стабільності мРНК і позбавлення протеолізу білка. Стабільність мРНК в клітинах *E. coli* забезпечується введенням мутацій інактивуючих РНК-ази, а стабілізація чужорідних білків здійснюється введенням мутацій типу lon або hptR.

Окрім клітин *E. coli* генетична інженерія використовує інші мікроорганізми, що мають надзвичайно цінні властивості. Це актиноміцети – продуценти значної частини відомих антибіотиків бацили – продуценти ферментів, вітамінів, антибіотиків, засобів боротьби з комахами; дріжджі – для виробництва вина, пивоварінні, виробництві мікробіологічного білка для годівлі сільськогосподарських тварин; псевдомонади з якими пов'язують надії на розробку ефективних біологічних засобів охорони навколишнього середовища.

Але однією з найважливіших проблем було та залишається на сьогодні перенос генетичної інформації з послідуєчою експресією не лише в культури клітин, а й у цілий організм. Найбільш ефективний і перспективний підхід для переносу генів – пряма ін'єкція чужорідної ДНК в заплідненні яйцеклітини та ранні ембріони з метою розширення можливостей рекомбінантного процесу та одержання трансгенних тварин.

Досліди Дж. Гордона, проведені у 80-х роках по одержанню трансгенних мишей стали класичними і використовуються у сьогоднішні при одержанні трансгенних сільськогосподарських тварин. Основними вимогами для одержання успішних результатів є:

- вибір, виготовлення і клонування чужорідних генів;
- одержання зигот і виявлення пронуклеосів;
- мікроін'єкція відповідного гена в видимий пронуклеус;
- трансплантація зиготи у статеві шлях гормонально підготованої самки;
- оцінка народжених тварин за генотипом і фенотипом інтеграція чужорідної ДНК, експресія ДНК, виявлення продукту гена (наприклад гормону росту) і вплив на ознаку (наприклад висока інтенсивність росту).

У даний час успішно одержують трансгенні кролі, вівці, свині і худобу. Дослідження із створення трансгенних тварин-продуцентів біологічно активних речовин, медичних препаратів ведеться в багатьох світових лабораторіях. Розроблено біотехнологію одержання фактора згортання крові із молока трансгенних овець, який би міг використовуватись для лікування гемофілії. Розробляються аналогічні проекти з одержання інсуліну, інтерферону, гонадротропних гормонів.

Таким чином, генетична інженерія представляє собою перспективний напрямок сучасної біотехнології, мета якої створення тварин з реконструйованими генотипами. На основі методів генетичної інженерії мікроорганізмів у багатьох країнах світу налагоджено промислове виробництво гормонів, амінокислот, інтерферонів, ферментів, вакцин, антибіотиків та інших біологічно активних речовин.

Одержання і трансплантація ембріонів

Трансплантація ембріонів розглядається як біотехнологічний метод відтворення, з допомогою якого можна одержати декілька ембріонів від тварини-донора з метою пересадки їх в статеві органи тварин-реципієнтів. Використовуючи реципієнтів для пересадки ембріонів, одержаних від одної корови-донора, можна збільшити число її нащадків в десятки і сотні разів. Теоретично від корови-донора з високим генетичним потенціалом за продуктивністю упродовж життя можна одержати не менше 500 телят.

Біотехнологія трансплантації ембріонів включає ряд послідовних етапів: відбір донорів, викликання суперовуляції (поліовуляції) у донорів, осіменіння донорів, одержання ембріонів та їх оцінка, культивування або заморожування ембріонів, пересадка ембріонів реципієнтам.

У селекційних програмах відбору донорів надається пріоритетне значення. Найбільш важливим критерієм на перших етапах відбору корів-донорів є їх висока племінна цінність, тобто здатність передавати гени високої продуктивності своїм нащадкам.

Спочатку племінну цінність корови-донора визначають за її власним фенотипом. Наприклад, за такими економічно важливими показниками, як молочна і м'ясна продуктивність, якість молока. Поряд з молочною продуктивністю для відбору донорів залежно від породи встановлюють мінімальні вимоги до інших селекційних ознак, таких як вміст жиру та

білка в молоці, придатність корів до машинного доїння, міцність конституції та інтер'єр.

Важливим показником у відборі є індекс осіменіння, тобто кількість осіменінь на одне запліднення. Низька заплідненість корів від першого осіменіння і високий індекс осіменіння вказують на погану відтворну здатність корів. В ідеальному випадку потенційна корова-донор повинна мати індекс осіменіння рівний 1. У корів-донорів після отелення не повинно бути ускладнень (мертвонароджуваність, затримка посліду, післяродові захворювання статевих органів).

Після відбору потенційних корів-донорів приступають до індукування множинної овуляції або суперовуляції, шляхом використання гонадотропіну сироватки жеребних кобил (СЖК) у поєднанні з простагландинами та іншими біологічно активними речовинами. Таким способом можна викликати суперовуляцію приблизно у 70% корів. У даний час доведено, що реакція корів на поліовуляцію у значній мірі визначається кількістю та якістю фолікулів яєчників під час їх стимуляції гонадотропінами.

Результати суперовуляції визначаються ефективним осіменінням корів-донорів. У середньому лише 60-65% ембріонів є придатні для трансплантації, інші яйцеклітини, що утворилися в результаті гормональної обробки гонадотропінами залишаються або незаплідненими, або після запліднення відстають у розвитку чи дегенерують. Для штучного осіменіння корів-донорів необхідно використовувати спершу лише видатних биків-виробників, достовірно оцінених за якістю нащадків.

Штучне осіменіння корів-донорів здійснюють використовуючи три способи: візуальний (з використанням вагінального дзеркала), маноцервікальний (введення у вагіну руки і скороченої піпетки), ректоцервікальний (з фіксуванням шийки матки і контролем руху піпетки за допомогою руки, введеної в пряму кишку). День, в який приводиться штучне осіменіння корови-донора вважається датою запліднення. З цього дня, який у біотехнології трансплантації ембріонів великої рогатої худоби позначається нулем, починається відлік розвитку ембріонів *in vitro* до їх одержання.

Ефективність методу трансплантації залежить у значній мірі від способу одержання ембріонів. Запліднені яйцеклітини від суперовульованих корів-донорів можуть бути одержані трьома способами: після забою корови-донора, хірургічним і нехірургічним.

Простим і надійним способом добування ембріонів є забій корови. Відомо, що яйцеклітини після овуляції і запліднення на четверту добу переходять із яйцепроводів в роги матки. Отже, якщо зиготи добувати не пізніше, як через три доби, то достатньо промити лише яйцепроводи. Для вимивання ембріонів потрібно в цьому випадку 20 мл поживного середовища.

Важливим моментом, що забезпечує ефективність одержання ембріонів хірургічним способом, є визначення стадії їх розвитку і місця перебування в статевих шляхах корови-донора. Після успішного запліднення яйцеклітини на п'яту добу ембріони в стадії 16-32 клітин, тобто ранньої морули, досягає рогів матки. Для трансплантації рекомендується використовувати бластоцисти, тому ембріони добувають між 7-8-ми добами після штучного осіменіння. Є кілька способів хірургічного добування ембріонів: розріз верхнього зводу вагіни, лапаротомія по білій лінії черева та лапаротомія в ділянці голодної ямки. Найбільшого розповсюдження має метод лапаротомії по білій лінії черева.

Як спосіб забою корови-донора так й хірургічний спосіб добування ембріонів є дорогими і не дають можливості багаторазового використання донора. Тому ці способи застосовуються в рідких випадках, головним чином у наукових цілях. Добування ембріонів нехірургічним способом полягає в введенні у ріг матки двоканального катетера з надувним балончиком. Вихід із рогу матки закривають, надуваючи цей балончик повітрям. У ріг вводять промивну рідину об'ємом до 500 мл. Після вимивання ембріонів у матку вводять розчин антибіотиків з метою антисептики.

Маніпулювання з ранніми ембріонами, що знаходяться на предімплантаційних стадіях розвитку, тобто від моменту їх одержання до введення в ріг матки реципієнта, займає від 1 до 5 годин. В цей період слід створити оптимальні умови, які забезпечать збереження їх біологічних якостей.

Ембріони корів можна зберігати шляхом пересадки їх в яйцепровід самок інших ссавців, наприклад кролячих. Тепер широкого розповсюдження набув спосіб зберігання ембріонів у поживних середовищах, які містять солі, вітаміни, амінокислоти та відповідні буферні розчини. Крім того, середовища містять сироватку крові та антибіотики. Найбільш універсальними є поживні середовища Ігла і Дюльбекко.

Важливим моментом є правильна оцінка одержаних ембріонів. Придатними для трансплантації є ембріони, одержані на 7-8-й день після осіменіння. Нормально розвинуті ембріони містять непошкоджені рівномірно по ширині опалесцюючі оболонки і цитоплазму в стані дроблення відповідно віку ембріона. В цілому оцінка ембріонів здійснюється за 5-ти бальною шкалою: відмінні, добрі, задовільні, умовно придатні, непридатні.

Як реципієнта відбирають гінекологічно здорових корів чи телиць з добрими екстер'єрними даними. Основною умовою доброго приживання ембріонів служить синхронність проявлення статевої охоти у донора і реципієнта. Розроблено декілька способів синхронізації, із яких найефективнішим виявився метод з використанням простогландину F2α.

Пересадка ембріонів реципієнтам проводиться рідше хірургічним і найчастіше нехірургічним способами. При хірургічному способі використовують лапаротомію по білій лінії черева. Нехірургічна пересадка проводиться подібно до одержання ембріонів. Найбільш розповсюджений спосіб нехірургічного інплантування – введення ембріона в ріг матки через шийку – цервікальний спосіб.

Для довготривалого зберігання ембріонів (створення банків) проводять глибоке заморожування в рідкому азоті за -196°C . Захист ембріонів від руйнування в процесі заморожування і розморожування здійснюють шляхом використання кріозахисних речовин (кріопротекторів): легко проникаючий у клітину гліцерол у концентраціях від 0,25 до 1,00 М.

Біотехнологія біологічно активних речовин

Біотехнологія одержання амінокислот

Біологічна повноцінність раціону сільськогосподарських тварин у значній мірі залежить від наявності в ньому окремих, особливо незамінних амінокислот, їх недостача негативно впливає на ріст і розвиток та може призвести до різних захворювань. Серед можливих способів одержання амінокислот найбільше значення мають мікробіологічний та хімічний і менше – одержання амінокислот із білкових гідролізатів.

Методом органічного синтезу в даний час одержують значні кількості амінокислот високого ступеня чистоти. Але у результаті цього одержують рацемати – суміші D- і L-форм, які у подальшому вимагають доволі складного і дорогого очищення. Присутність D-форм амінокислот є небажаною, оскільки не засвоюється організмом (за винятком гліцину і метіоніну).

У сучасній світовій практиці за допомогою мікробіологічного синтезу одержують більш ніж 60% всього об'єму амінокислот і доля його буде зростати, оскільки цей спосіб має цілий ряд переваг порівняно з іншими, зокрема: високими технологічними показниками та можливістю організувати в межах одного підприємства одержання як кормових, так й препаратів високого ступеня чистоти. Цим методом одержують лізин для потреб сільського господарства і медицини, глютамінову кислоту, триптофан, гістидин та інші амінокислоти.

Біотехнологія мікробного синтезу білка

Виробництво біомаси за допомогою мікробного синтезу – основний шлях зниження та ліквідації дефіциту білка перед традиційними способами його одержання. Мікробіологічний синтез має цілий ряд істотних переваг: швидкість росту і нагромадження біомаси мікроорганізмів значно вища, ніж у тварин. Мікроорганізми здатні нагромаджувати значну кількість білка (60-75%), процес біосинтезу одностадійний та протікає в м'яких умовах і менш трудомісткий порівняно з одержанням сільськогосподарської продукції, хоч вони не повинні виключати одне одного.

Для виробництва кормової біомаси використовують очищені п-парафіни, нафтові дистиляти, а також природний газ, які є основним джерелом вуглецю. Але враховуючи нестабільність цін на нафту та їх тенденцію до різкого зростання використання таких субстратів є

проблематичним, а одержана продукція неконкурентноздатною. Перспективними в цьому плані є вирощування мікробної біомаси на нижчих спиртах – метанолі та етанолі, які можна одержувати з різноманітних відходів промисловості.

В останній час широкого застосування для виробництва біомаси кормових дріжджів набули відходи харчової промисловості – брага і бурякова меляса.

Мікробіологічний синтез вітамінів

Вітамінами називають низькомолекулярні органічні сполуки, які присутні в низьких концентраціях як природні компоненти ензиматичних систем, які каталізують певні реакції. Залежно від розчинності їх поділяють на жиророзчинні і водорозчинні вітаміни. До жиророзчинних вітамінів відносять вітаміни: А, D, Е, К, F до водорозчинних – вітаміни: B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, B_с, PP, H, C, і P.

Одержання вітамінів і їх раціональне використання – одна з важливих проблем забезпечення повноцінними продуктами харчування людей та кормів для сільськогосподарських тварин. У природі біосинтез вітамінів, як правило, здійснюється рослинами і мікроорганізмами. Хінони і кобаламіни синтезуються виключно мікроорганізмами. Мікробіологічним шляхом одержують ергостерин, убіхінони, вітамін B₁₂.

Мікроорганізми використовують як селективні окиснювачі сорбіту у сорбозу при одержанні вітаміну C, а також для виробництва вітамінних концентратів (вітаміну B₂, β-каротину) і коензимних форм ряду вітамінів (коферменту B₁₂, ФАД, КоА). В останнє десятиліття досягнуто значних успіхів у галузі вивчення мікробіологічного синтезу вітамінів, розширено і доповнено уявлення про біохімічні функції ряду вітамінів, одержані мікробні мутанти, за допомогою яких розшифровано і уточнено окремі етапи біосинтезу і способи регуляції синтезу окремих вітамінів.

Біосинтез гормонів

Гормони – це органічні сполуки, які синтезуються залозами внутрішньої секреції (ендокринні залози) і активно впливають на метаболічні, морфогенетичні та фізіологічні процеси. Гормони ссавців за хімічною природою поділяються на три великі групи: 1 – білки і пептиди, 2 – похідні амінокислот, 3 – стероїди.

Ураження залоз внутрішньої секреції (цукровий діабет, карликовість, тиреотоксикоз) призводить до важких захворювань, які в окремих випадках без належного лікування закінчуються летально. Цукровий діабет і карликовість в останні роки набули значного поширення, в тому числі в розвинутих країнах.

Лікування гормональними препаратами одержаними з окремих тканин сільськогосподарських тварин (підшлункова залоза) і трупного матеріалу (гіпофіз людей) не завжди ефективно та веде до багатьох ускладнень. Мікробіологічний синтез гормонів людини (інсуліну, соматотропного гормону (СТГ), соматостатину тощо) набув в останні роки особливого поширення завдяки досягненням генетичної інженерії мікроорганізмів. Таким способом з використанням бактеріальних ферментів рестриктаз і лігаз та рекомбінованих ДНК одержують чистий інсулін і СТГ людини, які не мають побічних домішок та використовують як терапевтичні засоби лікування у медицині.

Біотехнологія одержання ферментних препаратів

Ферменти або ензими – це високоспеціалізований клас речовин білкової природи, які каталізують різноманітні хімічні реакції у живих організмах. Класифікація ферментів за механізмом дії включає 6 класів:

1. Оксидоредуктази – каталізують окисно-відновні реакції.
2. Трансферази – каталізують реакції переносу, різноманітних груп.
3. Гідролази – каталізують реакції гідролізу.
4. Ліази – каталізують приєднання груп до подвійних зв'язків або навпаки їх відщеплення з утворенням подвійних зв'язків.
5. Ізомерази – каталізують реакції ізомеризації.
6. Лігази (синтази) – каталізують реакції синтезу з використанням енергії АТФ.

Використання мікробних ферментів в окремих галузях промисловості почалась давно і набуло широкого поширення у наш час у зв'язку з вдосконаленням технології їх одержання та одержання високопродуктивних штамів мікроорганізмів. Основну частину ферментів, які надходять на ринок становлять гідролази (α -амілаза, β -амілаза, глюкоамілази), їх застосовують у харчовій промисловості.

Інша група гідролаз – протеолітичні ферменти, які прискорюють гідроліз пептидних зв'язків (пепсин, трипсин тощо). У промисловості їх класифікують за здатністю проявляти активність в певних межах: кислі протеази (рН 1,5-3,7), протеази (рН 6,5-7,5), лужні протеази (рН 8,0).

Імобілізація ферментів

Імобілізовані ферменти (лат. *immobilis* – нерухомий) – ферменти певним способом приєднанні до нерозчинного носія. Імобілізованими також вважають ферменти, які поміщені у сіткоподібну полімерну матрицю, крізь яку вільно проникають низькомолекулярні субстрати, коферменти і продукти реакції, але не проходять макромолекули білка – ферменту. Потреба використання ферментів у біотехнології, медицині, харчовій промисловості стала причиною їхньої імобілізації. Імобілізація дає змогу підвищити стабільність ферментів, здатність до регуляції і можливість їх багаторазового використання. Розрізняють фізичні та хімічні методи імобілізації.

За фізичного способу використовують як адсорбційний спосіб, так й механічне включення молекул ферменту в структуру носія. В процесі імобілізації не утворюється ковалентний зв'язок між ферментом та носієм, а в процесі імобілізації ферментів хімічним методом між носієм і ферментом утворюються ковалентні зв'язки. Носій може бути як мінерального, так й органічного походження. Найкращим носієм для хімічної імобілізації ферментів вважається целюлоза та її похідні.

Ковалентне з'єднання ферменту та носія проводять за допомогою посередника (містка). Це низькомолекулярна структура містить декілька функціональних груп: хлористий ціанур, глутаровий альдегід, 2,4-динітро-3,5-дифтор-бензол тощо. Як лікарські препарати імобілізовані ферменти широко використовують у медицині для лікування різноманітних захворювань.

Застосування імобілізованих ферментів (лактази) дає можливість одержувати так зване “безлактозне” молоко. Багато людей, особливо в країнах Азії і Африки, через відсутність в їхньому організмі ферменту лактази нездатні засвоювати лактозу. Імобілізовані ферменти можуть бути використані і при виробництві сиру. Використання імобілізованого реніну дає можливість забезпечити належну економічну ефективність виробництва.

Імобілізація дає змогу широко використовувати імобілізовані ферменти для точного визначення сечовини, сечової кислоти, органічних кислот, амінокислот, глюкози, етанолу, антибіотиків та інших речовин у лабораторних дослідженнях.

Біотехнологія одержання антибіотиків

Антибіотики – це речовини, як правило мікробного, а також рослинного і тваринного походження та продуктів, їх хімічної

модифікації, які в низьких концентраціях пригнічують розвиток бактерій, нижчих грибів, найпростіших, вірусів або клітин злоякісних пухлин.

Промисловість випускає понад 100 видів антибіотиків. Головну частину всієї продукції складають п'ять груп антибіотиків:

- пеніциліни;
- тетрацикліни;
- стрептоміцини;
- еритроміцини;
- цефалоспорини.

Вони знайшли своє використання як лікарські препарати в медицині, ветеринарній медицині, а також в сільському господарстві як ростові фактори. Застосування антибіотиків дозволяє додатково одержати від 1000 свиней 100-120 ц м'яса, від 1000 курей-несучок до 15000 яєць в рік.

Продуцентами антибіотиків у більшості випадків є гриби (актиноміцети). Промисловість випускає кормові препарати на основі хлортетрацикліну – біовіт, а на основі окситетрацикліну – теравіт як у рідкому, так і сухому вигляді.

РОЗДІЛ 2

Лабораторно-практичні основи біотехнології

Правила роботи та техніка безпеки в лабораторії

1. У лабораторії можна працювати тільки в спеціальному одязі (халат, шапочка).
2. На робочому місці підтримувати чистоту і порядок.
3. Всі пляшки, флакони, колби і склянки після відбору реактиву відразу закривати корками і ставити на місце.
4. Щоб зберегти реактиви чистими, рештки невикористаної речовини не можна повертати в реактивні пляшки, флакони, колби і склянки. Реактиви загального користування не можна переносити на свої робочі місця.
5. Концентровані луги і кислоти наливати під витяжною шафою. При розбавленні концентрованих кислот завжди кислоту лити у воду, а не навпаки.
6. Пробувати реактиви на смак, а також їсти і курити в лабораторії забороняється.
7. При роботі з отруйними речовинами (спирти, ефіри, ацетон, бензол, фенол, солі важких металів та ін.) дотримуватись застережних заходів, щоб уникнути попадання їх на шкіру і слизові оболонки.
8. У випадку попадання кислоти чи лугу на руки або обличчя необхідно швидко змити їх водою і нейтралізувати (кислоту – розчином NaHCO_3 ; луг – 2% розчином борної кислоти) і повторно промити водою.
9. Після закінчення роботи злити з пробірок розчини до відповідного посуду і привести робоче місце до порядку.
10. Не можна залишати в лабораторії без догляду включені електричні прилади та газові пальники.

ТЕМА 1.

КУЛЬТУРИ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ КЛІТИН

Лабораторна робота №1

Тема. Приготування поживних середовищ для культивування рослинних клітин.

Мета: ознайомитись із складом поживних середовищ, освоїти техніку їх приготування та стерилізації.

Завдання: приготувати поживне середовище для індукції та росту калусної культури тютюну *Nicotiana plumbaginifolia*.

Теоретичні основи

Основою для створення поживних середовищ щодо вирощування культур тканин рослин є суміш мінеральних солей (макро- і мікроелементів), оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело Карбону вводиться в склад середовища у вигляді цукрози або глюкози. Окрім, Карбону, кисню і водню для росту тканин необхідний Нітроген у вигляді нітратної або амоніачної солі, фосфор – у вигляді фосфату, Сульфур – у вигляді сульфату та йони K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Загальна концентрація всіх мінеральних елементів найвища у середовищах Мурасіге і Скуга, Ніча, Гамборга та Шенка.

Мінеральне живлення.

Нітроген. У складі більшості поживних середовищ Нітроген є у вигляді нітрату і лише в деяких середовищах (Мурасіге і Скуга, Гамборга та ін.), крім нітратів, додають солі амоніаку. Нітрати, як основне джерело азоту, вводяться в середовище в концентрації від 2,0 до 25 ммоль/л. У деяких випадках для інтенсивного росту калусних та суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату та амоніаку можна збільшити до 60 ммоль/л. Існує чітка кореляція між збільшенням сирової маси суспензії клітин рослин і використанням нітратів із середовища, що свідчить про значне перетворення нітратів в органічні сполуки. Виявлено, що в клітинній суспензії тютюну *Nicotiana tabacum* є активна, залежна від енергії система надходження нітратів у клітини. Вона індукується нітратом і пригнічується амінокислотами. Заміна 10-20% нітратів на солі амоніаку сприяє кращому росту тканини.

Фосфор. Для росту калусних тканин та ізольованих органів необхідним компонентом є фосфор, який використовується у вигляді ортофосфату. Крім цього, джерелом фосфорного живлення можуть бути

фосфати цукрів. Йони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} необхідні для культивування тканин у невеликих кількостях, однак вони важливу роль відіграють у процесі регулювання рН середовища.

Сульфур вносять до складу середовища у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну. **Ферум** вносять у поживне середовище у вигляді неорганічних солей (FeCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) і солей органічних кислот (цитриновокисле залізо). Доцільно вводити хелатуючі реагенти, такі як етилендіамінтетраацетатна кислота (ЕДТА). Наявність цієї сполуки в середовищі покращує доступ заліза за широкого діапазону рН. Окрім основних макроелементів, до складу більшості середовищ входять мікроелементи. Внесення певної кількості мікроелементів у середовище неминуче, оскільки солі макроелементів, які використовуються, завжди містять суміші мікроелементів.

Вуглеводневе живлення. У більшості середовищ для культур рослинних тканин, джерелом Карбону, Гідрогену та енергії є цукроза або глюкоза, як правило в концентрації 20-40 г/л. **Регулятори росту.** Для росту і диференціації будь-яких рослинних або тваринних клітин необхідні ауксини та цитокініни. Оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автономного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, тому їх ріст у значній мірі залежить від постачання екзогенних регуляторів росту. Відмінності у потребі в екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють виділити декілька груп тканин:

- тканини, які ростуть на середовищі з ауксинами (експланти топінамбура, корені цикорію);
- тканин, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура з корінця білого турнепса);
- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експланти тютюну, тканини кореня моркви);
- тканини, які ростуть на середовищах складного складу;
- культури тканин пухлин, що здатні рости на середовищах без регуляторів росту.

Для отримання і підтримання культур тканин використовують: ауксини (індоліацетатну кислоту (ІОК) в концентрації 1,0-30 мг/л, α -нафтілацетатну кислоту (НОК) в концентрації 0,1-0,2 мг/л та 2,4-дихлорфеноксиацетатну кислоту (2,4-Д) у концентрації меншій, ніж 1,0 мг/л). Для індукції утворення калусу, як правило, використовують вищі концентрації ауксинів, а в процесі наступних пересадок тканина може рости при зменшеному у 10 разів вмісту ауксинів. Для росту клітин та

органів рослин у культурі *in vitro* як цитокініни використовують: кінетин (Кін), 6-бензиламінопурин (БАП) та ін.

Таблиця 1. Найпоширеніші поживні середовища для культивування рослинних клітин, тканин та органів.

Компоненти	MS	B5	WH	SH
Макроелементи: NH_4NO_3	1650	—	—	—
KNO_3	1900	2500	80	2500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	—	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	737	400
KH_2PO_4	170	—	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	134	—	—
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—	150	19	—
$(\text{CaNO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	—	—	288	—
KCl	—	—	65	—
Na_2SO_4	—	—	200	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	—	300
Мікроелементи: KJ	0,83	0,75	0,75	1
H_3BO_3	6,3	3,0	1,5	5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	13,2	6,65	13,2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	2,67	1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	—	0,1
MoO_3	—	—	0,0001	—
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,0001	0,2
$\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	—	—
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	—	—	2,5	—
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	—	—	—	0,1
Fe-хелат: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	—	20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	—	15

Вітаміни. Як відомо, більшість вітамінів, що входять до складу поживних середовищ, є коферментами, які каталізують різні важливі реакції. Зокрема, тіамін (вітамін B_1) входить до складу піруватдекарбоксилази, яка відіграє важливу роль у перетворенні вуглеводів, а також в окиснювальному декарбоксилюванні кетокислот. До складу поживних середовищ тіамін вводиться в кількості 0,1-10,0 мг/л. До складу багатьох середовищ входить піридоксин (вітамін B_6), який бере участь у процесах декарбоксилювання та переамінування амінокислот.

Нікотинова кислота у вигляді амідів входить до складу окиснювально-відновних ферментів – дегідрогеназ. У поживних середовищах концентрація нікотинової кислоти складає 0,5-1,0 мг/л. Відносно стабільне значення рН у середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів або відповідних сполук. Більшість стаціонарних культур ізольованих тканин росте на середовищах з рН 5,6-5,8. Таким чином, успіх в культивуванні культур клітин, тканин та органів рослин визначається складом поживних середовищ. На даний час розроблено багато варіантів поживних середовищ.

Обладнання і матеріали: ламінарний бокс для стерильних робіт з вертикальним та горизонтальним потоками повітря; автоклав; рН-метр, інструменти; лабораторний посуд (хімічні склянки, чашки Петрі, колби); хімічні реактиви (NH_4NO_3 ; KNO_3 ; H_3BO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KJ ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; цукроза, вітаміни: B_1 , B_6 , РР; мезоінозит, Кін, НОК, агар-агар).

Хід роботи. Приготувати поживне середовище для індукції та росту калусної культури тютюну *Nicotiana plumbaginifolia*. З цією метою використовують модифіковане середовище МС (вміст компонентів у мг/л):

NH_4NO_3	1650	KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170	H_3BO_3	6,2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KJ	0,83	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
B_1 (тіамін HCl)	0,1	B_6 (піридоксин HCl)	0,5
мезо-інозит	100	РР (нікотинова к-та)	0,5
Кін	0,2	НОК	2,0
цукроза	30,000	агар-агар	7500
рН	5,6 – 5,8		

Для економного використання часу та зусиль готуємо концентровані розчини макро-, мікроелементів, вітамінів, гормонів (так звані маточні розчини).

1. Приготування маточних розчинів:

а) MC_1 (маточний розчин макроелементів, де їх концентрація збільшена у 10 разів) в г на 0,5 л:

NH_4NO_3	8,25
KNO_3	9,50

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,20
NaH_2PO_4	0,85
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,85

Брати 100 мл маточного розчину на 1 л середовища.

б) MC_2 (маточний розчин Fe-хелат)

Солі, г	на 200 мл
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,492
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,112

Брати 5 мл маточного розчину на 1л середовища.

Вихідний розчин Fe-хелата (200 мл) готують, розчиняючи послідовно 1,492 г $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та 1,112 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та доводять до кипіння.

в) MC_3 (маточний розчин мікросолей, де їх концентрація збільшена у 100 разів).

Солі, мг на 100 мл:

H_3BO_3	62,0	KJ	8,3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	86,0		

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – зважити по 10 мг кожної солі та розчинити в 40 мл H_2O дист.; *брати 1 мл на 100 мл МС.* Брати 10 мл маточного розчину на 1 л середовища.

г) маточний розчин вітамінів

Вітаміни, мг на 100 мл,	B_1 (тіамін HCl)	10;
B_6 (піридоксин HCl) 50;	PP (нікотинова кислота)	50.

Брати 1 мл маточного розчину на 1 л середовища. Розчини вітамінів (1,0 і 0,1 мг/мл) готують безпосередньо розчиняючи їх в бідистиляті.

д) розчини фітогормонів	Розчини
НОК – 0,1 мг/мл	1 н NaOH
Кін – 1 мг/мл	1 н NaOH

Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ІОК, ІМК та їх аналогів (наприклад, концентрацію 1 мг/мл готують, розчинивши 100 мг речовини в 0,5-2 мл спирту, підігрівши та добавивши води до 100 мл). КІН, ЗЕА, БАП розчиняють попередньо в невеликій кількості 0,5 н HCl і при нагріванні добавляють потрібну кількість води. Якщо у середовище необхідно внести абсцизову кислоту (гормон рослинний), то її розчиняють в 70% етанолі і доводять до потрібного об'єму. Гіберелову кислоту (входить до складу фітогормонів) розчиняють безпосередньо у воді і добавляють у поживні середовища, простерилізувавши через мембранні фільтри. Кокосове молоко добавляють у поживні середовища, попередньо

підігрівши його впродовж 30 хв. за 60°C та простерилізувавши фільтруванням (діаметр мембранного фільтра складає 0,20-0,45 мкм).

Антибіотики та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклавуванні, додають до поживних середовищ (40-50°C) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6-5,8.

2. Після приготування маточних розчинів приготуйте середовище: Маточні розчини на 1000 мл:

МС ₁	100 мл	МС ₂	10,0 мл
МС ₃	5 мл	Вітаміни	2,0 мл
Мезо-інозит	100 мг	Цукроза	30,0 г
НОК	1 мл	Кін	1,0 мл

рН 5,6 – 5,8

3) Після введення в середовище всіх компонентів додайте дистильовану воду до потрібного об'єму і доведіть рН до 5,6-5,8.

4) Середовище простерилізуйте автоклавуванням 20-25 хв за 0,8-1,0 атм та 120°C.

Маточні розчини необхідно зберігати в холодильнику за температури +4°C не більше місяця. Розчин вітамінів можна заморожувати і зберігати в невеликих кількостях.

Лабораторна робота №2

Тема. Отримання рослинних суспензійних культур.

Мета: підібрати склад поживних середовищ та штами калусної культури для отримання рослинних суспензійних культур.

Завдання: приготувати рідкі поживні середовища RMNO та RMP для культивування калусних культур з метою одержання рослинних суспензійних культур.

Теоретичні основи

Рослинні суспензійні культури складаються з поодиноких клітин і клітинних агрегатів, які ростуть в аерованому поживному середовищі певного складу. Для вирощування клітинних суспензій використовуються в основному ті ж поживні середовища, що і для калусних культур. Однак, на сьогоднішній день створені середовища, які використовуються безпосередньо для вирощування суспензійних культур, оскільки калусні та суспензійні культури значно відрізняються від кількості мінеральних солей, вітамінів, стимуляторів росту.

Суспензійну культуру можна отримувати двома шляхами: внесенням частинок раніше отриманого калусу у рідке поживне середовище; використанням експлантів тканин або стерильних проростків, які у рідкому середовищі утворюють калус. Інколи суспензійну культуру індукують певною кількістю гомогенату тканини, що містить у своєму складі як живі, так і зруйновані клітини. Для отримання високодисперсної суспензійної культури важливе значення має тип вихідної калусної тканини. Оптимальною вважається калусна тканина пухкого типу.

Аерація культур у рідкому середовищі забезпечується такими способами: 1) вирощуванням кусочків калусу на мостиках із фільтрувального паперу; 2) культурою клітин, поміщених у рідке поживне середовище на мішалках ротаційного або шейкерного типу (накопичувальне культивування); 3) вирощуванням клітин у рідкому поживному середовищі в культиваторах і ферментерах шляхом барботажу або барботажу в поєднанні з механічним перемішуванням (неперервне культивування).

Основна кількість робіт, виконаних на суспензіях, присвячена вивченню їх росту та метаболізму в накопичувальній культурі. Ріст клітинної популяції в циклі вирощування накопичувальної культури виражається S-подібною кривою. Цикл росту вимірюється часом від виходу культури в стаціонарну фазу. В процесі субкультивування клітини проходять послідовно наступні фази:

- 1) латентну або лаг-фазу; 2) експоненціальну фазу;
- 3) лінійну фазу; 4) стаціонарну фазу;
- 5) фазу загибелі клітин.

Звичайно нагромаджувальні суспензії культивують до стаціонарної фази росту, що у більшості випадків складає тривалість пасажу 21-28 днів і популяцію із 10^6 - $5 \cdot 10^6$ клітин/мл. Концентрація клітин у мл суспензії – *щільність клітинної популяції* – один із важливих показників стану клітинної системи в суспензії. Кількість клітин у мл дисоційованої суспензії визначається загальноприйнятим способом – підрахунком після нанесення на сітку лічильної камери Горяєва або Фукса-Резенталя.

Характерною особливістю суспензійних культур рослинних клітин є морфологічна і біохімічна гетерогенність. Клітинна популяція містить клітини, які відрізняються за формою та розмірами. Однією із цікавих особливостей, що виявлена при вирощуванні суспензійних культур, є залежність їх розмноження від одночасної або попередньої присутності в середовищі активних клітин, що діляться. Індукувати поодинокі клітини до поділу можна, розташовуючи їх в контакт із калусною тканиною, що

росте; посівом на тверде середовище біля кусочка тканини (тканина-нянька) або, культивуючи в середовищі, в якому раніше росла суспензія.

Ріст суспензії в значній мірі залежить від вихідної клітинної щільності інокулюму. Кожна культура має тільки їй притаманну вихідну мінімальну ефективну щільність популяції (мінімальний інокулюм, із якого можна індукувати ріст стаціонарної суспензійної культури), нижче якої значно подовжується лаг-період, або ж зовсім не спостерігається ріст.

Обладнання і матеріали: ламінарний бокс для стерильних робіт з вертикальним та горизонтальним потоками повітря; автоклав; рН-метр, інструменти; лабораторний посуд (хімічні склянки, чашки Петрі, колби); хімічні реактиви (NH_4NO_3 ; KNO_3 ; H_3BO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KJ ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; цукроза, вітаміни B_1 , B_6 , РР, мезоінозит, Кін, НОК, агар-агар), апарати для перемішування АБУ-6с, штами раніше отриманих калусних культур

Хід роботи. 1. Приготуйте рідкі поживні середовища RMO, 4-х та RMP з половинним вмістом мікро- та макроелементів (див. табл.2).

Таблиця 2. Склад твердих поживних середовищ

Компоненти	RMO	RMOP	RMB
Макро- і мікроелементи	МС	МС	МС
Мезоінозит	100	100	100
B_1	1	1	1
ІОК	2	-	-
БАП	0,5	1	1
НОК	-	0,1	-
Цукроза, г/1000 мл.	30	20	30
Агар, 7-8 г/л.	+	+	+
рН	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

2. Виберіть отриману раніше калусну культуру *N. plumbaginifolia* пухкої консистенції.

3. В асептичних умовах розділіть калус на фрагменти і помістіть його в колби з рідкими поживними середовищами (див. вище).

4. Суспензію культивують в темноті при 25-26°C. на апаратах для перемішування АБУ-6с.

5. Для врахування росту суспензійних культур визначають відносний приріст сирової маси за формулою: $(W_t - W_o):(W_o \cdot 100)$, де W_o – початкова маса суспензії; W_t – маса суспензії через 21 день культивування.

6. При обробці експериментальних даних застосовують стандартні методи обробки результатів (Лакін, 1980).

Лабораторне заняття №3 **Тема. Культивування тваринних клітин**

Мета: ознайомитися з технікою дезагрегації тканини м'язового мішка курячого ембріону 9-11 денної інкубації та поживними середовищами, які використовуються для одержання первинно-трипсинізованих культур клітин.

Завдання: одержати первинно-трипсинізовану культуру клітин із м'язового мішка курячого ембріону 9-11 денної інкубації.

Теоретичні основи

Культура клітин – це вирощування окремих клітин або невеликих їх груп на твердих або рідких середовищах в умовах *in vitro*. Методика культивування клітин особливо успішно стала розвиватися і удосконалюватися після 40-х років. Цьому сприяли такі обставини: відкриття антибіотиків, що запобігали бактеріальному забрудненню культур клітин, відкриття Гуангом (1943) і Ендерсом (1949) здатності вірусів викликати специфічну деструкцію клітин (цитопатичний ефект) – вигідний метод індикації вірусів у культурах клітин і, накінець, Дульбекко і Фогі (1952) запропонували методику трипсинізації тканин і одержання одношарових культур клітин.

В біотехнологічній практиці використовують такі культури клітин:

Первинно-трипсинізовані культури клітин – це клітини, виділені безпосередньо із органів і тканин організму, що ростуть *in vitro* в один шар. Таку культуру клітин можна одержати практично із будь-якого органу чи тканини тварин.

Перещеплені культури клітин – це клітини, що здатні до розмноження поза організмом довготривалий час. У лабораторних умовах ці культури підтримують шляхом пересівів із однієї посудини в іншу (при умові заміни поживного середовища).

Перещеплені клітини одержують із первинних культур клітин шляхом довготривалих пересівів. Робота триває кілька місяців.

Вважають, що механізм походження перещеплених культур клітин - результат генетичної мінливості клітин або селекції поодиноких клітин, що присутні в первинній вихідній культурі. Клітини перещеплених культур мають однакову форму, гетероплоїдний набір хромосом (у первинних клітин він диплоїдний), стабільні в умовах росту *in vitro*, деякі з них володіють онкогенною активністю.

У практиці найбільш широке використання набули лінії: HeLa (із ракової пухлини шийки матки жінки); Нер-2 (карциноми гортані людини); KB (із ракової пухлини порожнини рота); ВНК-21 (нирка новонародженого хом'яка); ПНТ (перещеплена нирка теляти).

Диплоїдні культури клітин — це морфологічно однорідна популяція клітин, стабілізована в процесі культивування *in vitro*, що має обмежений термін життя і характеризується трьома фазами росту, зберігаючи в процесі пасажу каріотип, властивий вихідній тканині.

Диплоїдні культури клітин, як і перещеплені, одержують із первинних культур. Каріотип клітин дуже лабільний і при звичайних методах культивування змінюється в перші дні. Тому виникла необхідність розробки спеціальних методів обробки тканин, високої якості поживних середовищ, застосування фетальної сироватки для довготривалого підтримання диплоїдного каріотипу клітин *in vitro*. Це завдання вперше успішно вирішили американські вчені Гайнфлік і Мургед (1961). Перевага диплоїдних клітин перед первинними і перещепленими полягає в тому, що 10-12 днів вони можуть зберігати життєздатність без зміни поживного середовища; вони особливо придатні для довготривалого культивування вірусів.

Хід роботи. Курячі ембріони 9-11-денної інкубації піддають овоскопії та відбирають яйця з рухливими ембріонами і добре вираженими судинами. На шкаралупі простим олівцем відзначають межі повітряної камери та розташування зародка. Поверхню шкаралупи протирають йодованим етанолом та обпалюють. Стерильними ножицями зрізають шкаралупу на 2-3 мм вище межі повітряної камери, розривають підшкаралупну і хоріоалантоїсну оболонку. Переносять ембріон у чашку Петрі, видаляють головку, крила, ніжки та внутрішні органи. Шкірно-м'язовий мішок, що залишився, подрібнюють і 2-3 рази відмивають розчином Генкса від кров'яних елементів, слизі та переносять у колбу для трипсинізації. Додають 0,15%-ний розчин трипсину, підігрітого до 35-37°C (у співвідношенні тканини і трипсину 1:3), ставлять на магнітну мішалку.

Трипсинізацію ведуть поетапно, тобто через кожні 3-5 хвилин, від'єднані клітини разом з трипсином зливають у центрифужні пробірки на льоді (для припинення дії трипсину на клітини). До залишку в колбі додають нову порцію трипсину. Процес ведуть до повного розчинення тканини. Після трипсинізації суспензію клітин у розчині трипсину центрифугують 20 хвилин за 1000 об/хв, надосадову рідину зливають, а осад клітин ресуспендують у поживному середовищі (37°C) і фільтрують через 3-шаровий марлевий фільтр. Після перемішування беруть 1 мл клітин для підрахунку. Успіх культивування клітин залежить від посівної дози. За малої кількості клітин не спостерігається утворення моношару, навіть при довготривалому культивуванні. За дуже великої кількості клітин проходить інтенсивна їх проліферація, і утворений шар клітин значно раніше піддається старінню та неспецифічній дегенерації. Підрахунок клітин проводять у камері Горяєва.

До 1 мл суспензії клітин додають 1 мл 0,1%-ного розчину кристалвіолету, приготованого на 0,1 N розчині цитринової кислоти. Після перемішування камеру заповнюють та проводять підрахунок всіх клітин, що мають ядро і неушкоджену цитоплазму. Після підрахунку клітин розводять поживним середовищем так, щоб в 1 мл містилося від 0,7 до 1 млн. клітин. Найбільш доступним та простим методом консервування культур клітин є зберігання їх за 4°C.

Розчини і поживні середовища, що використовуються в роботі з культурами клітин.

Розчин Генкса: в 1 л бідистильованої води (в грамах): 8,0 NaCl; 0,4 KCl; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,14 CaCl_2 ; 0,06 KH_2PO_4 ; 0,06 Na_2HPO_4 ; 1,0 глюкози; 0,02 фенолроту; 0,07 NaHCO_3 .

Розчин Ерла: в 1 л бідистильованої води (в грамах): 6,8 NaCl; 0,4 KCl; 4,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 CaCl_2 ; 0,125 NaH_2PO_4 ; 2,2 NaHCO_3 ; 1,0 глюкози.

Ці сольові розчини використовують для приготування всіх поживних середовищ, оскільки вони забезпечують стабільність рН, осмотичний тиск у клітинах і необхідну концентрацію неорганічних речовин. Зараз у біотехнологічній практиці найбільш широке використання набули середовище 199 та Ігла. До їх складу входить більше 60 компонентів: 20 амінокислот, 17 вітамінів, компоненти нуклеїнових кислот, джерела ліпідів, 8 мінеральних солей. Для пригнічення росту грибів використовують натрієву сіль ністатину по 100 мкг на 1 мл середовища.

ТЕМА 2. ОДЕРЖАННЯ ГОНАДОТРОПІНУ ТА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ

Лабораторне заняття №4

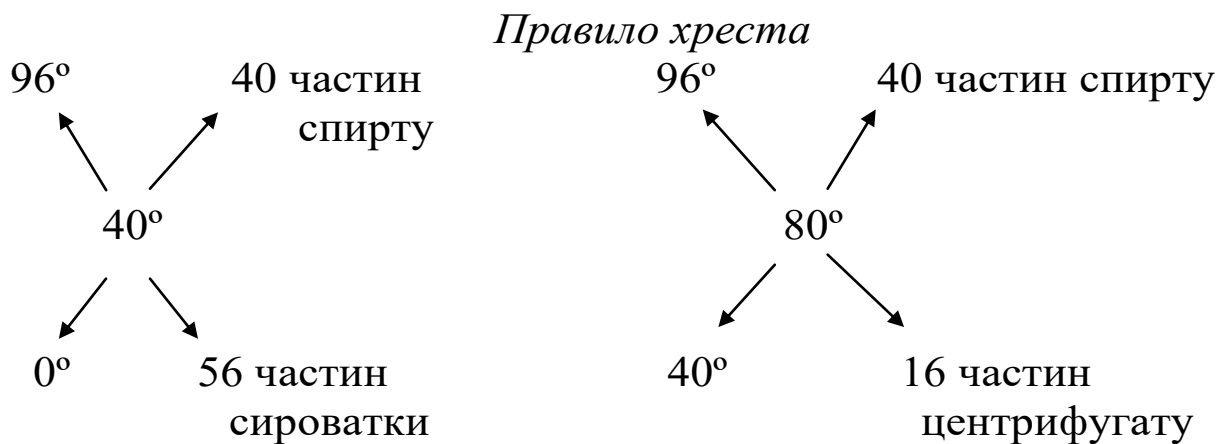
Тема. Одержання гонадотропіну із сироватки жеребної кобили

Мета: ознайомитись з процесом одержання гонадотропіну в лабораторних умовах.

Завдання: одержати порошок гонадотропіну із сироватки жеребної кобили.

Теоретичні основи

Гонадотропіни синтезуються базофільними клітинами передньої долі гіпофізу. До цих гормонів відносяться фолікулостимулюючий (ФСГ, фолітропін) і лютеїнізуючий (ЛГ, лютропін). Ці гормони є складними білками – глікопротеїнами. ФСГ викликає дозрівання фолікулів в яєчниках у самок і сперматогенез у самців. ЛГ у самок стимулює секрецію естрогенів і прогестерону, а також розрив фолікулів з утворенням жовтого тіла, а у самців – секрецію тестостерону.



Хід роботи.

Осадження альбумінів і глобулінів. До 10 мл сироватки або плазми крові поступово (впродовж 15-20 хвилин) додати декілька мілілітрів 50% розчину ацетатної кислоти до рН-4,5. При цьому слід постійно проводити помішування з допомогою скляної палички. Значення рН перевіряють універсальним індикаторним папірцем (можна також з допомогою рН-метра). Після досягнення значення рН у межах $4,5 \pm 0,2$ до сироватки (плазми) крові поступово перемішуючи додати охолоджений ($0-2^{\circ}\text{C}$) спирт до 40°

концентрації (на 10 мл сироватки чи плазми крові необхідно додати приблизно 7 мл). При визначенні необхідного об'єму спирту слід користуватись правилом хреста, Осадження альбумінів і глобулінів проводити через 10 хвилин шляхом фільтрування або центрифугування впродовж 10 хвилин при 2-3 тис. об./хв.

Осадження гонадотропінів. Після фільтрування або центрифугування слід заміряти об'єм фільтрату (цетрифугату) з допомогою мірного циліндра. Фільтрат (центрифугат) переносять у ділильну лійку об'ємом 100-150 мл. Перемішуючи скляною паличкою додають охолоджений спирт до концентрації 80°. Об'єм спирту підраховують аналогічно, як за осаження альбумінів і глобулінів. Концентрацію спирту також можна вимірювати з допомогою спиртометра. Додавання спирту слід проводити поступово впродовж 10-15 хвилин. Через 1,0-1,5 години після додавання спирту наступить випадання осаду гонадотропінів. Повне осаження гонадотропінів настає через 10-12 годин. Після того як випаде осад гонадотропінів слід провести сифонування (відділення та збирання) верхньої прозорої частини з допомогою гумового шлангу, а нижню частину через краник ділильної лійки вилити у склянку і провести фільтрування або центрифугування впродовж 10 хвилин за 2-3 тис. об./хв.

Одержання порошку гонадотропінів. До осаду в пробірках додати 5 мл ацетону і перемішати скляною паличкою, після чого процентрифугувати (10 хвилин за 2-3 тис. об./хв). Цю процедуру слід повторити ще 2 рази. Залишки ацетону в пробірці над осадом гонадотропінів висушують на повітрі. За наявності ліофільної сушки проводять висушування гонадотропінів. До осаду гонадотропінів додають дистильовану воду, отриманий розчин переносять у целофановий мішочок для діалізу. Процес триває 10-12 годин. Після цього діалізат піддають ліофільній сушці. Вихід гонадотропінів з 10 мл сироватки (плазми) складає 10-15 мг.

ТЕМА 3.

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ОДЕРЖАННЯ МОНОЗИГОТНИХ І ХИМЕРНИХ ТВАРИН

Лабораторне заняття №5

Тема. Одержання монозиготних близнят та химерних тварин методами біотехнології.

Мета: ознайомлення з методами, які дають можливість одержання монозиготних близнят від високопродуктивних тварин та поєднати в одній тварині корисні господарські ознаки різних порід.

Завдання: в лабораторних умовах одержати монозиготних близнят та химерних тварин.

Теоретичні основи

Монозиготні (однойцеві, ідентичні) близнята – це близнята, які розвиваються з однієї заплідненої яйцеклітини (зиготи) при поділі її під час першого дроблення. Перші стадії дроблення зигот ссавців відбуваються за кратними числами з більш або менш однаковими за величиною бластомерами, які відрізняються округлою формою і малою диференціацією. З кожним новим поділом бластомери стають дрібнішими. Оскільки ріст, який характерний для поділу соматичних клітин, при дробленні не спостерігається. У бластомерів порушується ядерно-цитоплазматичне співвідношення – ядра, завдяки мітозу, зберігають свій об'єм, а цитоплазма з кожним черговим поділом зменшується вдвоє.

Пізніше, вже на стадії восьми бластомерів, помітна відмінність у їхніх розмірах (великі, темні – зародкові і малі, світлі – зовнішньозародкові). Починаючи з цієї стадії, дроблення стає асинхронним, тобто різні бластомери дробляться не однаково. Світлі діляться швидше, а темні – повільніше. Після того як бластомери, що діляться, утворюють щільну групу клітин (16-32) зародок перетворюється в ранню морулу, що буває на 4-5 добу після запліднення. Через 5-7 діб зародок – це вже є клітинний комплекс з 32-90 бластомерів, що називається пізньою морулою. Коли клітини морули починають виробляти рідину і перегруповуватися навколо центральної наповненої рідиною порожнини, то утворюється бластоциста на 7-8 добу.

Хід роботи. Одержання монозиготних близнят методами біотехнології збільшує вихід телят від одного донора. Для вирішення

цього завдання розроблено мікрохірургічні операції на ембріонах, а саме:

Видалення зони пеллюціда ембріонів і бластомерів, функція якої в період раннього розвитку ембріона полягає в тому, щоб не допустити розсипання бластомерів і безпосереднього контакту з другими ембріонами та сторонніми клітинами (лейкоцитами і сперматозоїдами). Видалення зони пеллюціда проводять двома методами: а) мікрохірургічним – за допомогою мікроножів; б) ензиматичним – інкубують в присутності протеолітичного ферменту.

Розділення бластомерів. Розділення проводять тоненькою голкою і гачком. Для нормального розвитку ембріонів раннього віку *in vivo* необхідна зона пеллюціда. Для захисту ембріонів з порушеною зоною пеллюціда англійський вчений Вілладсен (1979 рік) використав агар. Агар практично не розчинний у статевих шляхах самки і закупорює будь-які отвори в зоні пеллюціда, що дає можливість ембріональним клітинам вижити і розвиватися *in vivo*. Вілладсен опрацював техніку укладання ембріонів з порушеною зоною пеллюціда в агар. Зону пеллюціда видаляють і бластомери відділяють з групи клітин або розділяють. Виділені бластомери ін'єкують у порожню зону пеллюціда. Після заповнення перивітелінового простору сироваткою крові вівці, ембріони вводять у невеликий циліндр з агару, який поміщають у ще більший циліндр. Останній вводять у яйцепровід вівці з лігатурою до утворення ранньої бластоцисти. Потім агаровий циліндр виймають, ембріони звільняють з нього і пересаджують реципієнту.

При укладанні ембріона в агар він повинен бути повністю покритий ним так, щоб вільно переміщувались клітини всередині ембріона в період розвитку і взаємодії між собою. Циліндр з агару має бути невеликим за об'ємом, стійким до руйнування, тобто таким, щоб його можна було б легко ввести у яйцепровід.

В яйцепроводі вівці створюються сприятливі умови для розвитку ембріонів корови і свині, аж до стадії бластоцисти. Тому яйцепровід вівці з лігатурою використовують як стандартну схему для культивування мікроманіпульованих ембріонів усіх видів домашніх тварин. З цією метою може бути використаний яйцепровід анестральної вівці і не обов'язково використовувати овець з синхронізованою охотою як донора. Вілладсен експериментально довів, що поодинокі бластомери з 2-клітинного ембріона мають потенціальні можливості розвитку і з них можна отримати нащадків.

У овець 2-клітинні ембріони можна отримати лише впродовж дуже короткого часу – біля 48 годин після запліднення, а через 60 годин більшість ембріонів знаходиться на 4-клітинній стадії розвитку. Наступні експерименти Вілладсена (1980) показали, що однакові двійнята можна одержати з 4- і 8-клітинних ембріонів шляхом розділення бластомерів на групи. “Половинки” з 2-, 4- і 8-клітинних ембріонів є однаково життєздатними порівнюючи з нормальними ембріонами овець, їх можна зберігати у замороженому стані, що і було використано Вілладсеном при одержанні монозиготних двійнят. Виживання “четвертинок” ембріонів, одержаних шляхом розділення 4-клітинних ембріонів на окремі клітини або 8-клітинних ембріонів на 4 пари клітин, дещо нижче, ніж у нормальних.

Виживання ембріонів одержаних з окремих бластомерів 8-клітинних ембріонів майже нульове. Зниження виживання, очевидно пов’язане із зменшенням числа клітин у таких ембріонів під час бластуляції, що призводить до утворення дермальних міхурців у більшій кількості, порівняно з нормальною бластоцистою.

З практичної точки зору більш доцільним є одержання ембріонів у корів нехірургічним методом, тому ряд досліджень проведено на 5-6 денних ембріонах на стадії морули. Ембріони були розділені на “половинки” або “четвертинки”, розміщені в зону пеллюціда, укладені в агар і пересаджені в яйцепровід з лігатурою анестральної вівці на 1-2 доби. Потім їх виймали і пересаджували хірургічним способом реципієнтам на 6-й і 7-й день статевого циклу. Приживання “половинок” ембріонів складало 75% і не відрізнялось від проведеної пересадки інтактних ембріонів. Приживання “четвертинок” ембріонів складало 41% і було значно нижчим порівняно з пересадкою інтактних ембріонів корів. Ці спостереження дають можливість зробити висновок про здатність розділених ембріонів корів регулювати свій розвиток при зменшенні кількості клітин навіть на стадії компактизованої морули.

Розділені ембріони корів можуть зберігатись у замороженому стані. Після виймання з яйцепроводу з лігатурою вівці розділені (поділені) ембріони корів на стадії ранньої бластоцисти або пізньої морули Вілладсен заморожував і потім пересаджував реципієнтам. Після пересаджування поодиноких половинок приживалось 50% ембріонів, а після пересадки 2 половинок ембріонів – 67%, не спостерігалось при цьому приживання “четвертинок” ембріонів підданих заморожуванню. Ембріони корови на пізніших стадіях розвитку можна успішно використовувати для одержання однойцевих близнят при вилученні

ембріонів нехірургічним способом. У даний час у багатьох комерційних фірмах і науково-дослідних лабораторіях розділяють морули (біля 64 клітин), так і бластоцити (до 256 клітин) на дві половинки, кожна з яких містить однакове число клітин.

Розроблена техніка розділення і для 6-денних ембріонів свиней (Рорі, 1985). Скляною голкою розрізають внутрішню клітинну масу ембріона і приблизно 40% зони пеллюціда. Потім розрізають шар трофектодерми всередині зони пеллюціда. Одну половинку ембріону у власній зоні пеллюціда, а другу без неї пересаджують у 8-денному віці в ріг матки реципієнта на віддалі 5 см від матково-трубного з'єднання. Після пересадки половинок з 8 ембріонів одержано 4 живих поросят.

Одержання химерних тварин. Химерні тварини (генетичні мозаїки) – мозаїчні тварини, в яких різні групи клітин походять не від однієї, а від кількох зигот. Одержують їх двома методами:

Агрегаційний метод. Цей метод ґрунтується на злитті цілих ембріонів під час культивування.

Ін'єкційний метод. Він полягає у пересаджуванні клітин від іншого ембріона або соматичних клітин однієї особини в бластоцельну порожнину іншого ембріона. В такий спосіб одержують ін'єкційні химери.

Метод добування химер злиттям ембріонів, які відрізняються за генотипом, було розроблено польським ембріологом А.Тарковським у 1961 році. Суть його полягає в тому, що 8-клітинні ембріони інкубують у присутності протеолітичного ферменту, в результаті чого у них лізуються оболонки і зародки зливаються. Після чого їх трансплантують тварині-реципієнту. Народжені тварини-химери поєднують у собі ознаки обох ембріонів, тобто є нащадками чотирьох батьків.

Химер одержують пересаджуванням клітин з допомогою спеціальних знарядь. Зону пеллюціда ембріона розрізають мікроножем. Виймають ембріони тоненькою голкою і гачком. Далі батьківські ембріони поділяють на дві половини. Половини різних ембріонів об'єднують і поміщають в порожню зону пеллюціда. В одну зону пеллюціда можна вводити чотири половини двох батьківських ембріонів. Добуті таким чином ембріони-химери вводять у матку реципієнта. Як показник химеризму використовують колір масті новонароджених. У 1983 році групою С.Вілладсена одержано перші міжвидові химери сільськогосподарських тварин в результаті об'єднання клітин ембріонів вівці та кози. Вівцекоза поєднує в собі ознаки обох видів.

Химерні тварини не передають нащадкам ознак мозаїчності, оскільки відбувається розщеплення. Незважаючи на це, стосовно до сільськогосподарських тварин формування химер може послужити меті поєднання в одній тварині корисних ознак різних порід і сприятиме виведенню нових порід і породних груп тварин.

ТЕМА 4.

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ГЛЮКОАМІЛАЗИ І ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІММОБІЛІЗОВАНОГО І ВІЛЬНОГО ФЕРМЕНТУ.

Лабораторне заняття № 6

Тема. Визначення активності вільного та іммобілізованого на цеоліті ферменту глюकोамілази

Мета: дослідження впливу іммобілізації ферменту на його активність.

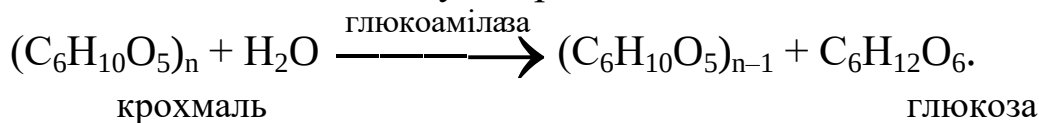
Завдання: вивчити активність вільного та іммобілізованого на цеоліті ферменту глюкоамілази.

Теоретичні основи

Глюкоамілаза Г20х – екзогенний ферментний препарат амілолітичного спектру дії. Він випускається у промислових обсягах в Україні Ладиженським заводом ферментних препаратів. Є високо очищеним препаратом, містить комплекс гідролітичних ферментів, які розщеплюють крохмаль. Це порошок світло-сірого чи світло-жовтого кольору, який добре розчинений у воді. Оптимальною для дії препарату є температура 30-40°C і рН 4,5–5,0. зберігається за температури +25°C у сухому приміщенні в герметичній тарі, оскільки він надто гігроскопічний. Промисловий препарат випускається з глюкоамілазною активністю 1000 Од./г та 2000 Од./г.

Використовується у харчовій промисловості для оцукрення крохмальвмісної сировини. У тваринництві глюкоамілаза застосовується як ферментна домішка до кормів раціону сільськогосподарських тварин, яка розщеплює крохмаль, мальтозу та інших олігоцукри до глюкози, завдяки чому підвищується рівень засвоювання кормів організмом тварин. Це сприяє підвищенню продуктивності тварин.

Хімізм реакції: Глюкоамілаза (К.Ф. 3.2.1.3. 1,4- α -D-глюкан глюкогідролаза) гідролізує α -1,4-зв'язки, послідовно відщеплюючи залишки глюкози від молекули крохмалю:



Наявність крохмалю визначають за реакцією з розчином йоду, а наявність глюкози – за реакцією Фелінга.

Матеріал й обладнання: 2%-ний свіжоприготовлений розчин крохмалю, 1,0%-ний розчин глюкоамілази (Г20х), реактив Фелінга, який готується перед заняттям змішуванням 50 мл 7,0% розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 50 мл 34,6% розчину сегнетової солі в 12,0% розчині NaOH , 4,0%-ний розчин йоду в йодистому калію, цеолітове борошно Сокирянського родовища, скляні пробірки на 20 мл, піпетки на 5 мл., водяна ванна, спиртовий термометр, скляграфі.

Хід роботи. У дві пробірки (контрольну та дослідну) вносять піпеткою по 3 мл розчину глюкоамілази. У дослідну пробірку додають 50 мг цеолітового борошна і струшують упродовж 5-7 хв (відбувається іммобілізація ферменту). В обидві пробірки додають піпеткою по 4 мл розчину крохмалю, змішують та поміщають у водяну ванну за температури 37°C на 20 хв.

Швидкість гідролізу крохмалю, тобто активність глюкоамілази та вплив іммобілізації на активність ферменту визначають за наявністю в іммобілізованому середовищі залишкового негідролізованого субстрату – крохмалю і продукту реакції – глюкози:

а) виявлення крохмалю: з кожної пробірки (контрольної та дослідної) після інкубації їх 20 хв. у водяній ванні за температури 37°C по 2 мл суміші переносять у дві чисті пробірки, додають до них по 3 краплі розчину йоду та змішують. Поява фіолетового забарвлення свідчить про наявність у розчині крохмалю;

б) виявлення глюкози: з контрольної та дослідної пробірок після інкубації їх у водяній ванні по 2 мл суміші переносять у дві чисті пробірки, додають до них по 2 мл реактиву Фелінга. Вміст пробірок змішують і підігрівають на полум'ї газового пальника до кипіння. Зміна синього забарвлення на червоно-цегляний свідчить про наявність у розчині глюкози.

Результати досліджень заносять в табл. 3, порівнюють забарвлення розчинів контрольної і дослідної пробірок, визначають різницю та роблять висновок про активність вільного та іммобілізованого ферментів.

Таблиця 3. Активність вільної та іммобілізованої глюкоамілази

Проби	Забарвлення з йодом (+, -)	Забарвлення з реактивом Фелінга (+, -)
Контрольна		
Дослідна		

Вивчення впливу йонів важких металів на активність іммобілізованого і вільного препарату глюкоамілази.

Активність ферментів, зокрема й глюкоамілази, залежить від дії різних факторів та їх поєднувального впливу. Вивчення можливості підтримання активності ферментів (особливо у виробничих умовах, коли в процесі живлення тварин на організм можуть впливати різні токсичні агенти) шляхом іммобілізації є одним з перспективних напрямків ведення галузі тваринництва за різних умов техногенного навантаження.

Матеріал й обладнання: 2%-ний свіжоприготовлений розчин крохмалю, 1%-ний розчин глюкоамілази (Г20х), реактив Фелінга, який готується перед заняттям змішуванням 50 мл 7% розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 50 мл 34,6% розчину сегнетової солі в 12% розчині NaOH , 4%-ний розчин йоду в йодистому калію, цеолітове борошно Сокирнянського родовища, 1%-ний розчин сульфату Купруму, 10%-ний розчин соляної кислоти, скляні пробірки на 20 мл, піпетки на 5 мл, водяна ванна, спиртовий термометр, склографи, скляні палички.

Хід роботи. У шість пронумерованих пробірок вносять піпеткою по 3 мл 1%-го розчину глюкоамілази. У 4-ту, 5-ту та 6-ту пробірки додають по 50 мг цеолітового борошна і струшують їх упродовж 5-7 хв. У 2-гу та 5-ту пробірки додають по 1 краплі 0,1%-вого розчину сульфату Купруму та по 1-й краплі 10%-вого розчину хлоридної кислоти (HCl). В усі шість пробірок піпеткою вносять по 3 мл 2%-вого розчину крохмалю, змішують і ставлять у водяну ванну за температури 36°C на 20 хв.

Вміст пробірок ділять наполовину. До однієї половини шістьох пробірок додають по 2 краплі 0,1 М розчину йоду, а з другою половиною пробірок виконують реакцію на глюкозу з реактивом Фелінга (як і в попередньому досліді).

Порівнюють інтенсивність забарвлення з йодом і відновлення $\text{Cu}(\text{OH})_2$ в усіх пробірках. Роблять висновок про вплив іммобілізації ферменту на його стійкість до інгібуючої дії йонів важких металів та рН середовища.

ТЕМА 5.

БІОКОНВЕРСІЯ ВІДХОДІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА ТА БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ БІОГАЗУ.

Лабораторне заняття № 7

Тема. Розрахунки основних параметрів біотехнологічного процесу переробки гнойової маси в біогаз

Мета: ознайомитись з методикою розрахунків виходу біогазу в процесі утилізації відходів сільськогосподарського виробництва.

Завдання: оволодіти методами математичного розрахунку процесів біоконверсії відходів сільськогосподарського виробництва в біогаз.

Теоретичні основи

Біогаз – це продукт обміну речовин в організмах багатьох груп бактерій. Відомо, що в метаногенезі, окрім метанових бактерій, беруть участь інші групи мікроорганізмів, а саме:

- бактерії, що перетворюють продукти деструкції целюлози в янтарну (сукцинат), пропіонову (пропіонат), масляну (бутират), молочну (лактат), ацетатну (ацетат) кислоти, спирти, CO_2 та H_2 ;

- ацетогенні бактерії, які зброджують утворені первинні метаболіти, синтезуючи ацетат, форміат (мурашина кислота), CO_2 та H_2 .

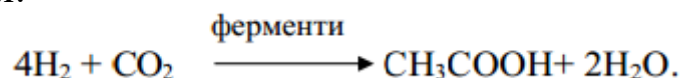
Утворені сполуки можуть входити в поживні субстрати для метаногенів. Умовно виділяють чотири стадії бактеріального метаболічного руйнування органічних субстратів з отриманням біогазу.

I стадія – бактерії-аероби за допомогою ферментів перетворюють високомолекулярні сполуки, що містяться в біомасі відходів (білки, поліцукриди, в основному целюлозу й ліпіди) у низькомолекулярні водорозчинні зброджувані метаболіти: цукри, амінокислоти, жирні кислоти. Процес гідролізу полімерних молекул органічного субстрату під дією екзоферментів бактерій (амілаз, протеаз, ліпаз) проходить повільно, що зумовлено рівнем рН середовища (оптимальний $\text{pH} = 4,5\text{--}6,0$) й тривалістю перебування перших у ферментаторі.

II стадія – до розщеплення залучаються кислотоутворювальні бактерії, в середину клітин яких проникають окремі молекули, де вони продовжують ферментативно змінюватись. З них в анаеробних умовах, коли $\text{pH}=6,0\text{--}7,5$, утворюються, у першу чергу, нестійкі карбонові кислоти: ацетатна, мурашина, молочна, янтарна, масляна, пропіонова, низькомолекулярні спирти (етанол) і гази – Карбон (IV) оксид, водень,

сірководень та амоніак. При цьому формуються необхідні умови для активації метанових бактерій (рівень рН знижується). Цей етап називають фазою біологічного окиснення.

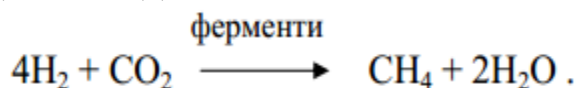
III стадія – проходить перетворення органічних кислот (бурштинової, мурашиної, масляної, молочної, пропіонової) на продукти, що є попередниками метану, а саме: ацетатну кислоту, Карбон (IV) оксид й водень. У цьому процесі беруть участь кислотоутворювальні (ацетогенні) групи бактерій, до яких належать *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*. Отже, в середовищі, де утворюється метан, обов'язкова наявність ацетатної кислоти відповідно до такого рівняння:



В організмі метанових бактерій, подібно до ацетогенів, синтез у клітинних структурах ацетату з CO_2 і H_2 відбувається через етап утворення метаболітів ацетил-КоА та пірувату.

IV стадія (останній етап) – продукти життєдіяльності метанових бактерій (*Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungati*) ацетат, діоксид Карбону й водень переважно перетворюються в метан (до того ж, саме на цьому етапі синтезується 90% усього метану). Слід підкреслити, що III стадія біосинтезу ацетатної кислоти відіграє найбільш відповідальну роль у швидкості процесу метаноутворення. Оптимальне значення показника рН при цьому підтримується на рівні 7 (його коливання можуть перебувати в діапазоні 6,6–8,0).

Основним джерелом енергії для метанових бактерій є саме молекула H_2 (донор водню) й діоксид вуглецю, який бере участь у біосинтезі клітинних речовин названих видів бактерій. Утворення метану відбувається за спрощеною відновною біокаталітичною реакцією, а саме:



Біохімічне перетворення водню й карбон (IV) оксиду на метан – складний багатоступеневий процес за участю багатьох структурних компонентів метанових бактерій, серед яких спеціалізовані ферменти, коферменти (небілкова частина ферменту). Основним чинником розщеплення органічного матеріалу на окремі складові компоненти й перетворення їх у метан (унаслідок метанового бродіння твердих субстратів) є водне середовище, оскільки більшість бактерій здатні споживати речовини тільки в розчиненій формі.

Якість біогазу залежить від вмісту в ньому метану або від співвідношення між першим (CH_4) і карбон (IV) оксидом (CO_2), який розчиняється в біогазі спричиняє його втрати під час зберігання. Забезпечення високої концентрації метану в біогазовій суміші відбувається завдяки таким критеріям:

- вибір оптимальної схеми проведення процесу одноступеневої або двоступеневої ферментації (у двоступених установках біогаз містить до 80% метану);

- дотримання кількісного та якісного складу поживних речовин субстрату (висока концентрація вуглеводів, протеїнів і ліпідів дає більш високий вихід метану; наприклад, виділений із субстратів, багатих на кукурудзу, біогаз містить в середньому 53% метану);

- підтримання температурного режиму в субстраті (якщо, наприклад, температура занадто висока, то у ферментаторі вихід метану нижчий через різну розчинність компонентів та кількість утворення CO_2 ; причому чим більша кількість CO_2 переходить у газоподібну форму, тим меншим буде вміст CH_4 в біогазі);

- обмеження кількості сірководню (H_2S) як дуже агресивного компоненту, що викликає корозію арматури, газових лічильників, пальників і двигунів, а відтак може виникнути потреба в очищенні біогазу від Сульфур.

Кількість амоніаку, елементарного азоту, водню й кисню в біогазовій суміші може становити 6–8%. Належить враховувати також, що газ, який надходить із біогазової установки, насичений водяною парою. Його сушіння способом конденсації сприяє збагаченню цього продукту. До цього ж за допомогою конденсату вдається сепарувати велику кількість амоніаку, що міститься в біогазі й може викликати значні пошкодження двигунів та підшипників з кольорових металів.

Конструктивно-технологічні параметри й технологічні схеми біогазових установок підбирають з огляду на об'єми переробки та властивості зброджуваного матеріалу, враховуючи тепловий режим, способи завантаження субстрату, інокуляту й ряд інших факторів. Основними елементами обладнання для проведення метаногенезу є метантенк, або герметично закритий резервуар, з теплообмінником (теплоносієм у ньому виступає вода, підігріта до 50–60°C), пристрої для введення поживних речовин і бактерій, а також відведення утвореного газоподібного продукту.

У деяких країнах метантенки конструктивно – це водонепроникні циліндричні цистерни, які називають дайджестерами (у них температура

зброджування становить 30–37°C, рН субстрату 7,0). Переробка органічного матеріалу триває 2-4 тижні. Над дайджестером встановлюють газгольдер, тобто сталевий циліндричний контейнер (або нейлоновий купол), його призначено для збору біогазу.

У приватних господарствах, на дачах можна будувати спеціальні дайджестери з цегли, цементу, глини й обкладати їх товстим шаром ґрунту, що сприяє кращому їх нагріванню та ізоляції від нічного охолодження. Функціональну схему отримання біогазу з органічних відходів сільського господарства подано на рис. 1.

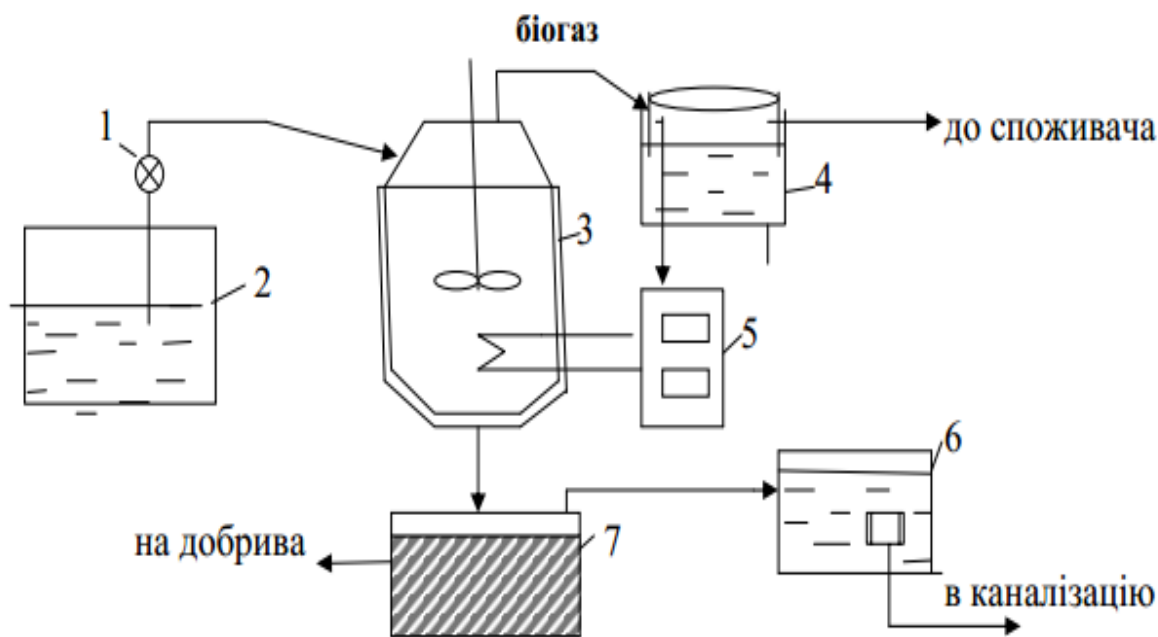


Рис. 1. Принципова схема біогазової установки для конверсії рідкого гною: 1 – насос; 2 – гноєприймач; 3 – біореактор-метантенк; 4 – газгольдер; 5 – котел для підігрівання води; 6 – аеротенк; 7 – гноєсховище

Для інтенсифікації метаногенезу органічний субстрат у таких установках додатково засівають ацетогенними й метаногенними бактеріями, серед яких розрізняють мезофіли (витримують температуру 30–40°C); термофіли, адаптовані до середовищ з температурою 50–60°C; психрофіли – до 20°C. Оптимальне масове співвідношення елементів С:N у субстраті для метаногенезу, перебуває в діапазоні 11–16:1. Причому підвищення вмісту азоту призводить до виділення амоніаку в середовище. Щоб цього уникнути, у відходи, які містять багато азоту, додають рослинні матеріали вуглеводного складу (подрібнену соломку, жом цукрової тростини, відходи цукрового буряку та ін.).

Взагалі, найчастіше біореактор виготовляють із залізобетону, що економить витрату металу. Об'єм апарата залежить від кількості гною,

який буде перероблятися, що у свою чергу, зумовлено чисельністю й масою тварин, а також способом видалення відходів (наприклад, у разі змивання безпідстилкового гною загальна кількість стоків небажано збільшується, що призводить до підвищення енерговитрат на їхнє підігрівання). Мінімальний термін витримки гною становить 12 діб. Отже, коли відома добова кількість стоків на підприємстві, то можна розрахувати необхідний об'єм біореактора, збільшивши отриману величину на 10% (оскільки реактор необхідно заповнювати субстратом на 90%). Для безперервної роботи біореактора в нього постійно завантажуються нові порції субстрату, при цьому відбирають відповідну кількість ферментованого продукту.

Обладнання й матеріали: таблиці з фізіологічними показниками тварин та нормативними даними, формули розрахунків.

Хід роботи. 1. Визначення кількості гнойової біомаси у господарстві, яка підлягає утилізації з одержанням біогазу. Одним із важливих факторів, що впливають на об'єм біогазу, є вид біомаси, яка використовується. Це пояснюється значними відмінностями в хімічному складі гнойової біомаси різних видів сільськогосподарських тварин.

1.1. Розрахунок добового та річного виходу гнойової біомаси. Вихід гнойової біомаси залежить від багатьох факторів: корму, виду та віку тварин, типу годівлі, способу утримання, технології видалення та нагромадження гнойової біомаси. Добовий вихід гною в процесі утримання тварин без підстилки визначається як сума екскрементів і кількості води, яка надходить із усіх джерел у систему гноєвидалення; у випадку утримання тварин із використанням підстилки, враховується її кількість.

1.1.1. Добовий вихід безпідстилкового гною. Визначається за формулою: $Q \text{ г.доб.} = (MEJ + VJ) \times n_j : 1000$ (1), де $Q \text{ г.доб.}$ – добовий вихід гною, т; MEJ – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл. 4); VJ – добова кількість води, яка надходить у систему гноєвидалення, кг; n_j – поголів'я тварин чи птиці виробничої групи, які одночасно утримуються на фермі або комплексі, гол. Добова кількість води (VJ), яка потрапляє в систему гноєвидалення, розраховується за формулою: $VJ = K \times MEJ$ (2), де MEJ – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл. 4); K – коефіцієнт (табл. 5).

1.1.2. Добовий вихід гнойової біомаси з використанням підстилки визначається за формулою: $Q \text{ г.доб.} = (MEJ + VJ + Mpn_j) \times n_j : 1000$ (3), де $Q \text{ г.доб.}$ – добовий вихід гною, т; MEJ – добова маса екскрементів від однієї голови, кг (табл.4); VJ – добова кількість води, яка надходить у

систему гноєвидалення; nJ – поголів'я тварин чи птиці виробничої групи, які одночасно утримуються на фермі чи комплексі, гол.; Mn_j - добова кількість підстилки на 1 гол., кг.

Таблиця 4. Добовий вихід калових мас та сечі (MEJ) від тварин, кг

Вид та вікові групи тварин	Вихід на 1 голову		
	кал	сеча	всього
ВРХ: корови	35	20	55
нетелі	20	7	27
телята віком 0-6 міс.	5,0	2,5	5,0
молодняк на відгодівлі: 6 міс.	10	5	15
9 міс.	10	9	19
12 міс.	14	12	26
Свині: свиноматки	3,1	3,0	6,1
Поросята: 0-2 міс.	0,8	2,5	3,3
2-4 міс.	1,4	2,2	3,6
Підсвинки до 6 міс.	1,6	2,6	4,2
Свині на відгодівлі	1,5	3,5	5,0
Кури			0,27-0,32
Індики			0,45-0,40
Качки			0,40-0,50
Гуси			0,60-0,70

Добова кількість води, яка надходить у систему гноєвидалення, розраховується за формулою 2.

Таблиця 5. Добова кількість води, яка потрапляє в систему гноєвидалення

№ п/п	Система видалення	Коефіцієнт, який розраховується від добового виходу екскрементів тварин
1	Транспортерна (конвейерна)	(0, 1-0,2) MEj
2	Самосплавна	(0,3-0,5) MEj
3	Лотково-змивна із сухою чисткою підлоги	(2,0-2,5) MEj
4	Лотково-змивна з вологою чисткою підлоги	(5,0-6,0) MEj
5	Гідрозмив	(7,0-8,0) MEj

1.1.3. Річний вихід гнойової маси. Річний вихід гною залежить значною мірою від способу утримання. В процесі цілорічного утримання тварин з використанням підстилки або без неї цей показник розраховується за такою формулою: $Q_{\text{г.річний}} = Q_{\text{г.доб.}} \times t$ (4), де t – кількість діб у році (365).

- за умов стійлово-табірного утримання тварин з використанням підстилки в приміщеннях (245 діб) і без підстилки в таборах (120 діб) добовий та річний вихід гнойової маси розраховується за формулою:

$Q_{\text{г.річний}} = [(ME_j + Mn_j + V_j) \times tn + (Mn_j + V_j) \times tl] \times nj : 1000$, т., де:

$Q_{\text{г.доб.}} = Q_{\text{г.річний}} : t$ (5), де t – обліковий час, діб (час утримання тварин в приміщеннях - tn ; у літніх таборах - tl , $t = 365$ діб);

- за умов стійлово-пасовищного утримання з використанням вигульно-кормових майданчиків, річне нагромадження гною скорочується на 30% і розраховується за формулою:

$Q_{\text{г.річний}} = [(ME_j + Mn_j + V_j) \times tn + (Mn_j + V_j) \times 0,3 \times tl] \times nj : 1000$,

$Q_{\text{г.доб.}} = Q_{\text{г.річний}} : t$ (6)

Примітка: стійлове утримання – 245 днів, пасовищне – 120 діб.

2. Визначення якісних параметрів гнойової біомаси.

На вихід біогазу суттєво впливає хімічний склад гнойової біомаси. У дослідях визначена залежність між об'ємом одержаного біогазу і вмістом сухої речовини в біомасі. Для гною великої рогатої худоби ця залежність є прямою; для курячого посліду – зворотною, що пояснюється інгібуючою дією високих концентрацій амоніаку на метаносинтезуючі мікроорганізми.

Оптимальними для вихідної гнойової біомаси є такі фізико-хімічні параметри: концентрація сухої речовини – 8-12 % (не більше 12 %), вміст органічної речовини – не менше 80 %, співвідношення C:N – 10-30:1; рН - 6,8-7,5. Для визначення вмісту сухої речовини у гнойовій біомасі необхідні дані щодо вологості гною, який виходить із ферми, а вона значною мірою залежить від способу утримання тварин та системи гноєвидалення.

2.1. Вологість гнойової біомаси, яка виходить із ферми.

2.1.1. Вологість безпідстилкового гною. В процесі безпідстилкового утримання тварин одержують рідкий гній, до складу якого входять екскременти тварин, певна кількість кормів, а також вода, яка потрапляє в систему гноєвидалення при митті обладнання, за рахунок витікання із

автонапувалок і водопровідної мережі тощо. Вологість безпідстилкового гною визначається за формулою: $W_r = (W_E + 100 Z) : (1 + Z)$ (7), де W_r – відносна вологість гною, %; W_E – відносна вологість екскрементів, % (табл. 6); Z – показник, який враховує кількість води, яка потрапляє в систему гноєвидалення (табл. 7).

Таблиця 6. Відносна вологість екскрементів тварин, %

Види тварин	Вологість, %		
	кал	сеча	суміш
ВРХ	83-84	94-95	86-87
Свині	76-78	94-95	87-88
Вівці	69-76	94-95	77-79
Коні	71-72	95-96	77-79
Кури	-	-	73-76
Індики	-	-	73-76
Качки, гуси	-	-	83-85

2.1.2. Вологість підстилкового гною. Вологість підстилкового гною визначається за формулою:

$$W_r = W_E - 0,01 \times P_n \times (W_E - W_n) + 0,01 \times P_v \times (100 - W_E) \quad (8), \text{ де}$$

W_r – відносна вологість гною, %; W_E – вологість екскрементів (табл. 5); W_n – вологість підстилки (соломи) – 19,6 %; P_n , P_v – співвідношення у гнойовій масі підстилки і води, %. P_n та P_v розраховуються за формулами:

Таблиця 7. Показник, який враховує кількість води, що потрапляє в систему гноєвидалення

№ п/п	Спосіб видалення гною	Z
1	Транспортерний	0,2-0,3
2	Самосплавний	0,4-0,5
3	Лотково-змивний з сухою чисткою підлоги	2,0-2,5
4	Лотково-змивний з вологою чисткою підлоги	5,0-6,0
5	Гідрозмив	7,0-8,0

$$P_v = (B_j \times 1000) : (M_{Ej} + B_j + M_{nj}), \% \quad (9)$$

$P_n = (M_{nj} \times 100) : (M_{Ej} + B_j + M_{nj}), \% \quad (10)$, де P_n – співвідношення в гнойовій біомасі води, %; P_v – співвідношення в гнойовій біомасі підстилки, %; M_{Ej} – добова маса екскрементів від однієї голови, кг; M_{nj} –

добова кількість підстилки на 1 гол., кг (табл. 7); V_j – добова кількість води, яка потрапляє в систему гноєвидалення, кг (формула 2).

2.1.3. Вологість гною за стійлово-табірною утримання. За цієї системи тварини можуть утримуватися 245 діб у приміщеннях із використанням підстилки і 120 діб – у таборах без використання підстилки. Вологість гною у цьому випадку розраховують за формулою: $W_r = [(W_1 \times 2) + W_2] : 3$ (11), де W_r – відносна вологість гною, який надходить з ферми, %; W_1 – відносна вологість гною в процесі підстилкового утримання, %; W_2 – відносна вологість гною за безпідстилкового утримання, %

Таблиця 8. Норми витрат підстилкового матеріалу (соломи), кг на одну голову на добу.

Вид і вік тварин	Спосіб утримання			
	У групових клітках	Прив'язний	Боксовий	Безприв'язний на глибокій підстилці
1. ВРХ				
- корови;	-	1,5	0,5	3,0
- відгодівля;	-	1,0	-	3,0
- молодняк.	1,0	1,5	0,5	1,5
2. Свині	0,5	-	-	-

2.1.4. Вологість гною, який надходить із ферми від різних виробничих груп. Визначається за формулою: $W_c = (W_1 + W_2 + \dots + W_n) : n$

2.2 Вміст сухої речовини у гнойовій біомасі. Визначається розрахунковим методом за формулою: $P_{a.c.p.} = [Q_r \times (100 - W)] : 100$, де $P_{a.c.p.}$ – вміст абсолютно сухої речовини у гнойовій біомасі, т; Q_r – вихід гною із ферми (добовий або річний), т; W – відносна вологість гною, %.

2.3 Вміст органічної речовини в гнойовій біомасі. Дослідженнями доведено, що у гнойовій мвсі різних видів сільськогосподарських тварин міститься в середньому до 80% органічної речовини і близько 20 % – неорганічної. Хімічний склад гною наведений у табл. 9.

Кількість органічної речовини у гнойовій біомасі, яку одержують від тварин за добу та за рік, визначається за формулою: $O_p = P_{a.c.p.} \times 0,8$, т, (14), де O_p – кількість органічної речовини в гної, т; $P_{a.c.p.}$ – вміст абсолютно сухої речовини, т.

Таблиця 9. Хімічний склад гною сільськогосподарських тварин, % у сухій речовині (за В. Баодеру, 1982).

Компоненти	Види тварин			
	ВРХ		Свині	Кури
	корови	відгодівля		
Органічна речовина	77-84	77-85	77-84	76-77
Сира клітковина	27,6-50,3	-	19,5-21,4	13,0-17,8
Сирий жир	2,9-4,3	-	3,5-4,0	2,4-5,0
Сирий протеїн	9,3-20,7	-	16,4-21,5	20,5-42,1
Лігнін	16-30	16-30	-	9,6-14,3
Азот	1,9-6,5	2,3-4,0	4,0-10,3	2,3-5,7
Фосфор	0,2-0,7	0,4-1,1	1,9-2,5	1,0-2,7
Калій	2,4	1,0-2,0	1,4-3,1	1,0 -2,9
Кальцій	2,3-4,9	0,6-1,4	-	5,6 -11,6
Магній	-	0,5-0,6	-	0,9-1,1

3. Визначення основних параметрів системи анаеробного зброджування гнойової біомаси (метантенка БГУ). Найбільш значимими параметрами анаеробного зброджування гнойової біомаси є добова продуктивність реактора або його пропускна здатність за кількістю гною, який виходить із ферми, добовий обсяг завантаження бродильної камери, об'єм реактора БГУ, добовий та річний вихід біогазу, залежно від хімічного складу гнойової біомаси тощо.

3.1 Добова продуктивність реактора, або його пропускна здатність щодо вихідного гною. Визначається за кількістю вихідної гнойової біомаси за формулою: $G_{\text{доб.}} = Q_{\text{р.чн.}} : (t_{\text{р.чн.}} - t_z)$, т/добу (15), де $G_{\text{доб.}}$ – добова продуктивність реактора щодо вихідного гною, т/добу; $Q_{\text{р.чн.}}$ – річна кількість гнойової біомаси на фермі, т; $t_{\text{р.чн.}}$ – кількість діб у році (365); t_z – тривалість запуску і обслуговування реактора, діб (у середньому 30 діб).

3.2. Добовий обсяг завантаження метанотанка, м^3 . Добовий обсяг завантаження метанотанка дорівнює добовому виходу з ферми рідкого гною вологістю 88-92%, т. $Q_{\text{доб.}}$ розраховується за формулою: $Q_{\text{доб.}} = (W_{\text{р2}} \times Q_{\text{г.доб.}}) : W_{\text{р1}}$, т, де: $W_{\text{р1}}$ – відносна вологість гною, який виходить з ферми, %; $W_{\text{р2}}$ – відносна оптимальна вологість гною (88-92%); $Q_{\text{доб.}}$ – добовий вихід гною на фермі, т.

Для переведення маси гною з т в м^3 користуються питомою вагою рідкого гною. Залежно від вологості, 1 м^3 гною відповідає:

1080 кг гною за вологості 88%;

1070	-//- -//- -//- -//- -//-	89%;
1060	-//- -//- -//- -//- -//-	90%;
1050	-//- -//- -//- -//- -//-	91%;
1040	-//- -//- -//- -//- -//-	92%.

3.3 Місткість (об'єм) бродильної камери. Рентабельність біогазового виробництва значною мірою залежить від об'єму бродильної камери. В процесі її проектування перш за все враховується кількість гнойової біомаси, яка підлягає утилізації. Об'єм бродильної камери визначається за формулою:

$V_k = (Q_{\text{доб}} \times 100) : p q$, (17), де: V_k – місткість бродильної камери, м^3 ; $Q_{\text{доб}}$ – добовий обсяг завантаження мттанїтїнка, м^3 ; p – добова доза завантаження, % (для мезофільного процесу – 7%, для термофільного процесу – 15%); q – коефіцієнт заповнення камери (в межах 0,8-0,95).

3.4. Обсяг газогенерації, або добовий та річний вихід біогазу. Максимальний вихід біогазу на стадії найбільш інтенсивного меганогенезу залежить від хімічного складу біомаси, який визначається видом тварин і відповідно, раціоном, який вони одержують. Так, з 1 кг сухої речовини гнойової біомаси, внесеної в реактор біогазової установки, теоретично можна одержати в середньому 0,4-0,6 м^3 біогазу. Враховуючи те, що тільки 40-50% сухої речовини гною у процесі метаногенезу трансформується в біогаз, реальний вихід біогазу із 1 кг сухої речовини гною великої рогатої худоби складає в середньому 0,2-0,5 м^3 , а із еквівалентної маси свинячого гною – 0,3-0,7 м^3 біогазу (реактор працює, на мезофільному режимі). Із біомаси курячого посліду біогазу виходить більше, ніж із гною великої рогатої худоби або свиней. Крім кількості сухої речовини, дуже суттєвим параметром, який впливає на вихід біогазу, є вміст і склад органічної речовини гнойової біомаси. Дані про хімічний склад гною подані у табл. 9.

Добовий вихід біогазу розраховується за формулами з врахуванням вмісту в гнойовій біомасі або тільки сухої речовини (ф.18) чи сухої та органічної речовин (ф.19): $V_{\Gamma} = [Q_{\Gamma} \times (100 - W) : 100 \times Z] : 100 \times K \times V$, м^3 , де: V_{Γ} – добовий або річний вихід біогазу, м^3 ; Q_{Γ} – добовий або річний вихід гною з ферми, т (кг); W – відносна вологість гною, %; Z – стан розкладання органічної речовини, % (30); K – коефіцієнт розчинності біогазу (1,1-1,5); V – питома вага біогазу (при вмісті за об'ємом: метану 65% та оксиду карбону (IV) 35% - дорівнює 0,00117 т/м³ або 1,17 кг/м³).

$V_{\Gamma} = [Q_{\Gamma} \times (100 - W) : 100] \times (L : 100) \times K \times \rho$, м^3 , де: V_{Γ} – добовий або річний вихід біогазу, м^3 ; Q_{Γ} – добовий або річний вихід гною, кг; W – відносна вологість гною, %; K – коефіцієнт зброджування органічної

речовини (0,3); ρ – вихід біогазу при зброджуванні 1 кг органічної речовини (0,7); L – вміст органічної речовини, % (80).

4. Визначення виходу залишкової продукції. Після зброджування гнойової біомаси та одержання біогазу, виходять тверда фракція гною (шлам) і надосадова рідина (рідка фракція). Кількість твердої і рідкої фракції залежить як від вологості гною, який завантажується, так і вологості фракцій, які одержуємо (твердої і рідкої).

4.1. Вихід твердої фракції (шламу). Визначається за формулою:

$M_{ш.річн.} = Q_{г.річн.} \times (W_{г.} - W_{ш.}) : (W_{р.} - W_{ш.})$ (20), де: $M_{ш.річн.}$ – річна маса шламу, т; $Q_{г.річн.}$ – річний вихід гною, т; $W_{р.}$ – вологість рідкої фракції, % (98-99); $W_{г.}$ – вологість гною, що завантажується, % (88-92); $W_{ш.}$ – вологість шламу, % (87).

4.2. Вихід рідкої фракції. Визначається за формулою: $M_{р.річн.} = Q_{г.річн.} \times (W_{г.} - W_{ш.}) : (W_{р.} - W_{ш.})$ (21), де: $M_{р.річн.}$ – річна маса рідкої фракції, т

Відповідно, добовий вихід рідкої і твердої фракцій визначається: $M_{ш.доб.} = M_{ш.річн.} : 365$ (22), $M_{р.доб.} = M_{р.річн.} : 365$ (23).

5. Визначення виходу товарного біогазу. Частина біогазу, яку отримують у процесі анаеробного бродіння, використовується для підігрівання біомаси, яка зброджується. Крім того вихід товарного біогазу значною мірою залежить від втрат теплової енергії за анаеробного бродіння.

5.1 Визначення теплової енергії, необхідної для підігрівання біомаси

Визначається за формулою: $\epsilon_{бгу} = C \times Q_{г.річн.} \times \Delta t$ (24), де: $\epsilon_{бгу}$ – тепла енергія, необхідна для підігріву гною до температури бродіння, МДж; $Q_{г.річн.}$ – річна кількість гною, яка виходить з ферми; кг; Δt – різниця температури зброджування і температури вихідного гною ($t_{бр}$ – $t_{гною}$), °C; C – питома теплоємність рідкого гною (4,19 КДж/кг·град).

Примітка: $t_{бр}$ залежить від режиму роботи БГУ, а t° вихідного гною складає у теплий період року (245 діб) в середньому +20°C; в холодний – +10°C (120 діб). Цей показник визначається окремо для теплового і холодного періоду року за формулами: $\epsilon_{бгу.тепл.період} = C \times Q_{г.доб.} \times 245 \times \Delta t$ (25), $\epsilon_{бгу.хол.період} = C \times Q_{г.доб.} \times 120 \times \Delta t$ (26), $\epsilon_{бгу.річне} = \epsilon_{бгу.тепл.період} + \epsilon_{бгу.хол.період}$ (27)

5.2 Визначення кількості біогазу, необхідного для підігріву біомаси. Визначається за формулою: $Q_{бг} = \epsilon_{бгу} : q$ (28), де: $Q_{бг}$ – кількість

біогазу, необхідного для підігріву біомаси, м^3 ; q – чиста теплотворна здатність біогазу ($q = 22 \text{ МДж/м}^3$)

5.3. Частка біогазу, необхідного для підігріву гною. Визначається за формулою: $\eta_n = Q_{bg} : V_{g.\text{річне}}$ (29), де: Q_{bg} – кількість біогазу, необхідна для підігріву біомаси, м^3 ; $V_{g.\text{річне}}$ – річний вихід біогазу, м^3 .

5.4. Максимально-теоретичний коефіцієнт виходу біогазу. Визначається за формулою: $K_{tb} = 1 - \eta_n$ (30), де: K_{tb} – коефіцієнт виходу товарного біогазу.

5.5. Визначення виходу товарного біогазу. Визначається за формулою: $V_{tg} = V_{g.\text{річне}} \times K_{tb}$ (31)

6. Оцінка рентабельності біогазового виробництва. Рентабельність біогазового виробництва визначається за деякими технологічними і економічними показниками. До технологічних показників належать: V_g обсяг газогенерації (річний та добовий) та вихід біогазу на 1 гол., 1 кг сухої та органічної речовини, 1 кг гнойової біомаси і 1 м^3 корисної площі реактора. Економічна оцінка визначається можливістю одержати з біогазу певну кількість теплової та електроенергії і заміни біогазом природних носіїв енергії.

РОЗДІЛ 3

Перелік питань для самостійного вивчення з дисципліни “Біотехнологія”

1. Предмет і методи біотехнології.
2. Історія становлення біотехнології як науки.
3. Використання біотехнології в народному господарстві та медицині.
4. Клітинна інженерія.
5. Загальна характеристика будови клітини.
6. Клітинний цикл.
7. Поживні середовища для культивування клітин.
8. Методичні підходи одержання культур клітин.
9. Пересадка ядер.
10. Клонування клітин.
11. Одержання гібридів клітин, гібридоми.
12. Моноклональні антитіла.
13. Типи клітинних мембран.
14. Середовище ГАТ.
15. Методи одержання рекомбінантних ДНК.
16. Одержання химерних тварин.
17. Методи одержання химерних тварин.
18. Пересадка ембріонів реципієнтам при трансплантації.
19. Кріоконсервація ембріонів.
20. Одержання вакцин генноінженерним методом.
21. Біоконверсія відходів сільськогосподарського виробництва.
22. Основні принципи одержання біогазу.
23. Мікробіологічні та біохімічні процеси при метаногенезі.
24. Первинна структура нуклеїнових кислот. Вторинна структура нуклеїнових кислот.
25. Подвійна спіраль ДНК. Типи подвійної спіралі ДНК та умови їх існування.
26. Реплікація ДНК. Компоненти які приймають участь в процесі реплікації. Ферменти цього процесу.
27. Синтез РНК. РНК-полімерази та їх участь в біосинтезі РНК.
28. Процесинг РНК. Перетворення гетерогенної ядерної РНК в зрілу мРНК у прокаріот та еукаріот. Сплайсинг.
29. Генетичний код і його розшифровка.

30.Елонгація синтезу поліпептидного ланцюга. Схема утворення пептидного зв'язку.

31.Біотехнологія конструювання рекомбінованих (гібридних) ДНК. Рестрикційні ендонуклеази (рестриктази) та їх роль в одержанні рекомбінантних ДНК.

32.Методи одержання генів.

33.Плазмідні вектори та їх роль в конструюванні гібридних ДНК.

34.Фагові вектори, їх перевага і недоліки.

35.Введення генів в ДНК векторів.

36.Реплікація рекомбінованих ДНК.

37.Забезпечення експресії чужорідних генів в клітині-господарі.

38.Транспозони і їх біологічна роль.

39.Мозаїчна будова структурних генів еукаріот.

40.Одержання бібліотеки клонів. Ідентифікація клонів.

41.Зворотна транскриптаза (ревертаза) і її біологічна роль.

42.Біотехнологія одержання генноінженерним шляхом інсуліну та соматотропіну.

43.Біотехнологія виробництва інтерферонів. Використання їх у тваринництві.

44.Перенос генетичного матеріалу в соматичні клітини.

45.Трансгенозис. Одержання трансгенних тварин.

46.Будова та функції амінокислот. Способи одержання амінокислот.

47.Виробництво амінокислот мікробіологічним синтезом.

48.Технологія одержання глютамату Na.

49.Технологія одержання L-лізину та кормових препаратів на його основі.

50.Виробництво кормового препарату РКЛ (рідкого кормового лізину).

51.Виробництво висококонцентратних кормових препаратів лізину.

52.Виробництво кристалічних високоочищених препаратів лізину.

53.Виробництво кормового концентрату лізину (ККЛ)

54.Характеристика продуцентів кормового білка.

55.Переваги мікробіологічного синтезу білка перед іншими способами одержання білка.

56.Сировинні джерела синтезу білка.

57.Одержання мікробного білка на метанолі та етанолі.

58.Особливості одержання мікробного білка на гідролізатах торфу.

59.Одержання мікробного білка на мелясі та зерно-картопляній бразі.

60.Мікробіологічний синтез вітамінів.

61. Характеристика мікроорганізмів продуцентів вітамінів групи В.
62. Біосинтез вітамінів В₂ та В₁₂.
63. Біосинтез вітаміну Д₂.
64. Біосинтез β-каротину.
65. Загальні відомості про іммобілізацію ферментів.
66. Переваги іммобілізованими ферментами над нативними.
67. Джерела ферментів. Методи виділення та очистки ферментів.
68. Фізичні методи іммобілізації ферментів.
69. Хімічні методи іммобілізації ферментів.
70. Носії для іммобілізації ферментів і вимоги до них.
71. Характеристика полісахаридів, як носіїв іммобілізованих ферментів.
72. Характеристика білків, як носіїв іммобілізованих ферментів.
73. Характеристика неорганічних адсорбентів.
74. Синтетичні полімерні носії для іммобілізації.
75. Використання іммобілізованих ферментів.
76. Класифікація та властивості ферментів.
77. Промислові ферментні препарати.
78. Вплив окремих факторів на біосинтез ферментів.
79. Методи культивування продуцентів ферментів.
80. Одержання товарних форм ферментних препаратів.
81. Асортимент окремих технічних препаратів і їх використання.
82. Механізм дії антибіотиків як лікарських речовин.
83. Антибіотики. Основні групи антибіотиків і їх коротка характеристика.
84. Механізм дії антибіотиків як ростових факторів.
85. Технологія одержання препаратів на основі 7-хлор-тетрацикліну.
86. Технологія одержання препаратів на основі 8-окси-тетрацикліну.
87. Біосинтез пеніциліну.
88. Технологія одержання препарату бацитрацину.
89. Технологія одержання препаратів гризину.
90. Технологія одержання препаратів гігromіцину Б.

**Тестові питання з дисципліни “Біотехнологія” для самостійного
опрацювання студентами заочної форми навчання
у міжсесійний період**

Тестові питання з теми: “Клітинна інженерія”

1. Клітинна інженерія це:

- а) методи одержання соматичних клітин;
- б) методи одержання окремих органел;
- в) метод конструювання клітин нового типу на основі культивування, гібридизації і реконструкції;
- г) методи культивування клітин, виділених з організму тварин та рослин;
- д) метод одержання ядер еукаріотичних клітин.

2. У мітохондріях проходять процеси:

- а) синтезу вуглеводів;
- б) продукція енергії у вигляді АТФ;
- в) модифікація вуглеводів;
- г) утворення лізосом;
- д) модифікація білків.

3. Рибосоми – органоїди, що пов’язані з процесами:

- а) нагромадження і видалення шкідливих речовин;
- б) біосинтезу білків;
- в) біосинтезу ліпідів;
- г) продукцією енергії у вигляді АТФ;
- д) модифікацією білків.

4. Процеси внутріклітинного перетравлювання під впливом гідролітичних ферментів здійснюються:

- а) ендоплазматичною сіткою;
- б) ядром;
- в) мітохондріями;
- г) лізосомами;
- д) рибосомами.

5. Ендоплазматична сітка здійснює:

- а) продукцію енергії у вигляді АТФ;
- б) біосинтез триацилгліцеролів, нагромадження ліпідів, синтез стероїдних гормонів, нагромадження і видалення шкідливих речовин;
- в) модифікацію білків;
- г) регуляцію білкового синтезу;
- д) утворення лізосом.

6. Реконструйована клітина – це:

- а) штучне об’єднання цілих клітин з утворенням гібридного геному;
- б) збереження життєздатності окремих клітин поза організмом;

- в) створення життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин;
- г) сукупність всіх генів клітин або організму;
- д) процес злиття нежиттєздатних каріопластів з життєздатними цитопластами з утворенням життєздатних клітин.

7. При конструюванні клітини використовують метод гібридизації, який полягає у:

- а) створенні життєздатної клітини із окремих фрагментів різних клітин;
- б) штучному об'єднанні цілих клітин з утворенням гібридного геному;
- в) збереженні життєздатності окремих клітин поза організмом;
- г) злитті двох типів нестатевих клітин;
- д) методи культивування клітин, виділених з організму тварин та рослин.

8. Культура клітин - це:

- а) обмін генетичним матеріалом між двома вихідними молекулами ДНК;
- б) сукупність всіх генів клітини або організму;
- в) збереження життєздатності окремих клітин поза організмом;
- г) створення життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин;
- д) процес вирощування рослини у лабораторних умовах з клітин, а не з насіння. Цю методику використовує як у традиційній селекції, так і в сільськогосподарській біотехнології.

9. Вперше культуру клітин тварин вдалося одержати:

- а) в 1907 році Гаррісоном;
- б) в 1949 році Ендерсоном;
- в) в 1955 році Іглом;
- г) в 1968 році Гарднером;
- д) в 1961 році Ф. Жакобом, Ж. Моно.

10. Гаррісон використав для одержання культури клітин:

- а) клітини зачатку м'язової тканини зародка жаби;
- б) клітини зачатку нервової системи зародка жаби;
- в) клітини зачатку шкіри зародка жаби;
- г) клітини курячого ембріону;
- д) клітини ембріону ховраха.

11. Лінія культури клітин виникає:

- а) із штаму шляхом селекції або клонування і має маркерні ознаки;
- б) шляхом гібридизації клітин;
- в) введенням в культуральне середовище мітогенів і створення умов для довготривалого існування клітин поза організмом;
- г) шляхом реконструювання клітини;
- д) із клітин, які можна культивувати поза організмом упродовж невизначено тривалого часу.

12. Маркером лінії HeLa є ферменти:

- а) глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа;

- б) глюкозо-6-фосфатізомераза;
- в) фосфофруктокіназа,
- г) 6-фосфоглюконатдегідрогеназа;
- д) глюкозо-6-фосфатаза.

13. До первинних культур клітин відносяться ті:

- а) що можуть існувати поза організмом довгий час (десятки років);
- б) що одержані з ембріональних тканин і зберігають тривалий час вихідні біологічні властивості, в т. ч. і постійний диплоїдний набір хромосом;
- в) що одержані з будь-якого органу, але через 2 – 3 тижні гинуть;
- г) що походять з мутантних клітин і мають здатність розмножуватися нескінченно довго;
- д) що вирощують у довготривалій культурі, ізольованих із рослинних пухлин різного походження, звільнених від патогенів, які індукують розвиток пухлин.

14. Переживаємі культури клітин одержують:

- а) з будь-якого органу, але через 2 – 3 тижні гинуть;
- б) з будь-якого органу і можуть існувати поза організмом тривалий час (десятки років);
- в) з ембріональних тканин;
- г) з гібридних клітин;
- д) а процесі інкубації ізольованих з різних органів рослин сегментів у стерильних умовах на поживних середовищах, які викликають або не викликають проліферацію цих сегментів.

15. Клітинну масу для культивування одержують шляхом обробки відповідного органу:

- а) пепсином;
- б) амілазою;
- в) трипсином;
- г) ліпазою;
- в) фосфатазою.

16. Введення в поживне середовище мітогенів супроводжується:

- а) гальмуванням процесу поділу клітин;
- б) контактним гальмуванням росту клітин;
- в) підвищенням здатності клітин до поділу;
- г) пригніченням реплікації ДНК;
- д) мутаціями ДНК.

17. Лектини – білки рослинного походження, які:

- а) гальмують процес поділу клітин;
- б) володіють мітогенними властивостями;
- в) здійснюють контактне гальмування росту клітин;

- г) володіють ферментними властивостями;
- д) забезпечують утворення активного комплексу (70 S рибосоми), до складу якого в прокаріот входять 30S і 50S субодиниці, мРНК та тРНК^{фмет}.

18.Халони – речовини, які:

- а) володіють мітогенними властивостями;
- б) використовуються як компоненти поживного середовища;
- в) гальмують процеси поділу клітин;
- г) стабілізують осмотичний тиск у поживному середовищі;
- д) здатні зв'язуватися із оператором на ДНК чи РНК, запобігаючи відповідно транскрипції або трансляції.

19.Клітинний цикл – це:

- а) всі процеси, що відбуваються у живій клітині;
- б) процес поділу клітини;
- в) існування клітини від поділу до наступного поділу або смерті;
- г) процес підготовки клітин до поділу;
- д) мітоз.

20.У G₁ – період клітинного циклу відбувається:

- а) підготовка клітини до поділу в т. ч. синтез білків;
- б) редупліковані хромосоми розходяться в дочірні клітини;
- в) активний ріст і функціонування клітини, обумовлений відновленням транскрипції і нагромадженням синтезованих білків та підготовка до синтезу ДНК;
- г) підготовка клітини до поділу в т. ч. синтез білків веретена;
- д) розходженням редуплікованих хромосом в дочірні клітини;

21.Період мітозу клітинного циклу супроводжується:

- а) реплікацією ДНК і подвоєнням хромосомного матеріалу;
- б) розходженням редуплікованих хромосом в дочірні клітини;
- в) підготовкою клітини до поділу в т. ч. синтез білків веретена;
- г) активний ріст і функціонування клітини, обумовлений відновленням транскрипції і накопиченням синтезованих білків та підготовка до синтезу ДНК;
- д) підготовка клітини до поділу в т. ч. синтез білків.

22.У G₂ – періоді клітинного циклу відбувається:

- а) підготовка клітин до поділу в т. ч. синтез білків веретена;
- б) активний ріст і функціонування клітини, обумовлений відновленням транскрипції і нагромадження синтезованих білків та підготовка до синтезу ДНК;
- в) реплікацією ДНК і подвоєнням хромосомного матеріалу;
- г) розходження у дочірні клітини редуплікованих хромосом;
- д) підготовка клітини до поділу в т. ч. синтез білків.

23. S – період клітинного циклу зумовлює:

а) активний ріст і функціонування клітини, обумовлений відновленням транскрипції і накопиченням синтезованих білків та підготовкою до синтезу ДНК;

б) підготовку клітин до поділу, зокрема. синтез білків веретена;

в) реплікацію ДНК і подвоєння хромосомного матеріалу;

г) розходження у дочірні клітини редуплікованих хромосом;

д) підготовка клітини до поділу в т. ч. синтез білків.

24.Тривалість клітинного циклу в клітинах становить:

а) 1-2 год.;

б) 10-50 год;

в) 5-10 год;

г) 6-12 год;

д) 8-20 год.

25.Клон – це:

а) сукупність всіх клітин;

б) група клітин, які утворилися з однієї клітини;

в) клітини, які одержані за допомогою гібридизації;

г) клітини, які одержані шляхом реконструкції;

д) молекула ДНК (плазмідна або вірусна ДНК), призначена для клонування ДНК-мішені.

26.Вперше здійснена пересадка ядер ссавців і одержано потомство на:

а) мишах;

б) вівцях;

в) кролях;

г) конях;

д) щурах.

27.У поняття синкаріон входять:

а) вірусні частинки бактеріальної клітини, які на відміну від еукаріотів не мають ядер;

б) гетерокаріон;

в) одноядерна гібридна клітина, яка утворюється при злитті соматичних клітин;

г) одноядерна гібридна клітина, яка утворилась при злитті пухлинної і нормальної клітини;

д) багатоядерна гібридна клітина.

28.Під гетерокаріоном розуміють:

а) набір хромосом, що є характерним для виду, особини або клітини;

б) одноядерну гібридну клітину, яка утворюється при злитті соматичних клітин

в) багатоядерна клітина, яка містить ядра не менше як двох різних типів;

г) багатоядерна гібридна клітина;

д) вірусні частинки бактеріальної клітини, які на відміну від еукаріотів не мають ядер.

29.Середовище ГАТ, що використовується для відбору гібридних клітин, складається з:

- а) гіпоксантину, аміноптерину і тимідину;
- б) гуаніну, аланіну і тіаміну;
- в) гліцеролу, аланіну і триптофану;
- г) урацилу, цитозину, фенілаланіну;
- д) гіпоксантину, аміноптерину і цитозину.

30.Гібридома – клітинний гібрид одержаний:

- а) при злитті двох соматичних клітин;
- б) при злитті нормальної антитілоутворюючої клітини і пухлинної клітини мієломи;
- в) при злитті двох пухлинних клітин;
- г) при злитті двох нормальних антитілоутворюючих клітин;
- д) при злитті двох гаплоїдних клітин.

31.Моноклональні антитіла – це:

- а) однакові за структурою і специфічністю антитіла, біосинтез яких здійснюється гібридомами;
- б) антитіла, одержані із гібридних клітин;
- в) антитіла, які володіють високими лікувальними властивостями;
- г) специфічні антитіла, біосинтез яких здійснюють соматичні клітини;
- д) специфічні антитіла, біосинтез яких здійснюють Т-клітини.

32.Мієломні клітини – це:

- а) нормальні клітини кісткового мозку;
- б) одноклітинні гібридні клітини, які утворюються при злитті соматичних клітин;
- в) клітини пухлини кісткового мозку, які знаходяться в стадії проліферації;
- г) гетерогенна популяція клітин, які диференціюються під впливом фабрицієвої сумки;
- д) багатоклітинні гібридні клітини, які утворюються при злитті соматичних клітин.

33.Комплементарна ДНК – це:

- а) макромолекула, утворена під час сполучення генів у новій комбінації;
- б) штучно синтезована ДНК, за допомогою ревертази і ДНК-полімерази, копія і-РНК;
- в) штучно створена гібридна молекула ДНК, яка не має аналогів у природі;
- г) тетрамер, що складається з чотирьох ідентичних поліпептидних ланцюгів із молекулярною масою 20000, бере участь у реплікації ДНК;

д) невеликі кільцеві молекули ДНК мітохондрій, які кодують деякі компоненти мітохондрій.

34. Антитіла за своєю хімічною природою відносяться до:

- а) ліпідів;
- б) гліколіпідів;
- в) білків;
- г) вуглеводів;
- д) нуклеїнових кислот.

35. До спряжуючих мембран відносяться усі нижче перераховані, крім:

- а) внутрішньої мембрани мітохондрій;
- б) мембрани тилакоїдів;
- в) мембрани ендоплазматичного ретикулуму;
- г) мембрани хроматофорів;
- д) зовнішня мембрана мітохондрій.

36. Проміжні філаменти:

- а) визначають форму поверхні клітини та є необхідними для переміщення усієї клітини;
- б) забезпечують механічну стійкість і опірність проти зовнішнього тиску;
- в) визначають положення мембранних органел і внутрішньоклітинний транспорт;
- г) швидко реорганізуються з утворенням веретена поділу, війок або джгутиків;
- д) виконують роль транспортного човникового механізму.

37. Актинові філаменти:

- а) визначають форму поверхні клітини та є необхідними для переміщення усієї клітини;
- б) забезпечують механічну стійкість і опірність проти зовнішнього тиску;
- в) визначають положення мембранних органел і внутрішньоклітинний транспорт;
- г) швидко реорганізуються з утворенням веретена поділу, війок або джгутиків;
- д) підтримують осмотичний тиск.

38. Мікротрубочки:

- а) визначають форму поверхні клітини та є необхідними для переміщення усієї клітини;
- б) забезпечують механічну стійкість і опірність проти зовнішнього тиску;
- в) визначають положення мембранних органел і внутрішньоклітинний транспорт;
- г) є дволанцюговими полімерами білка актину;
- д) швидко реорганізуються з утворенням веретена поділу, війок або джгутиків.

39. Мембранні рецептори:

- а) сполуки, що утворюються в організмі в процесі проміжного обміну;
- б) шар зародкових клітин між ектодермою й ентодермою;
- в) речовини білкової природи, в молекулах яких часто містяться залишки глюкози, що локалізовані в плазматичній мембрані;
- г) органічні сполуки, котрі викликають стимуляцію або інгібування процесів росту і розвитку рослин;
- д) білок, здатний взаємодіяти з регуляторною послідовністю (оператором) гена і блокувати його транскрипцію.

40. Клітинні мембрани побудовані з :

- а) білків та вуглеводів;
- б) ліпідів та білків;
- в) нуклеїнових кислот та ліпідів;
- г) геміцелюлози та лігніну;
- д) нуклеозидів та амінокислот.

Тестові питання з теми: “ Генетична інженерія”

1. Генетична інженерія – це:

- а) розділ молекулярної генетики, що ґрунтується на вивченні генома;
- б) розділ молекулярної біології, що ґрунтується на розробці біотехнологічних прийомів спрямованого синтезу нових, таких, що не існують у природі, поєднань генів;
- в) розділ молекулярної генетики, що ґрунтується на вивченні структури генів;
- г) розділ молекулярної біології, що ґрунтується на вивченні РНК;
- д) сфера знань про структурно-функціональну організацію генетичного апарату й механізми реалізації генетичної інформації.

2. Ген – це:

- а) ядерна ДНК;
- б) частина молекули РНК;
- в) ділянка ДНК, що кодує структуру одного або кількох полінуклеотидних або поліпептидних ланцюгів;
- г) комплексна сполука порфірину з двовалентним залізом, входить до складу гемопротейдів.
- д) кільцева ДНК вірусу SV40 в комплексі з гістонами клітини-господаря.

3. Геном – це:

- а) сукупність усіх генів або хромосом клітин чи організму;
- б) сукупність структурних генів;
- в) гени, які кодують біосинтез тільки поліпептидних ланцюгів;
- г) кількість копій того чи іншого гена в клітині;

д) властивість хімічних, фізичних і біологічних факторів ушкоджувати структурно-функціональний стан генетичних детермінант клітин.

4. Рекомбінанта ДНК – це:

а) ДНК, яку одержують внаслідок обміну генетичним матеріалом між двома молекулами ДНК;

б) одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотної транскрипції;

в) позахромосомна молекула ДНК;

г) ділянки ДНК в еукаріотичних клітинах, що багаторазово повторюються і не транслюються;

д) фермент, який забезпечує зміну кількості супервитків у кільцевій замкнутій ДНК.

5. Бактеріофаг це:

а) вірус, який здатний до реплікації в бактеріях;

б) фактор, який викликає конюгацію бактерії;

в) плазміда, що використовується в генетичній інженерії для одержання рекомбінантних ДНК;

г) інфекційні агенти, представлені низькомолекулярною кільцевою одноланцюговою РНК, викликають хвороби рослин;

д) вірусна частинка, позаклітинна форма існування вірусу.

6. Одержання рекомбінантної ДНК використовуються як вектор:

а) білок, який інгібує транскрипцію;

б) бактеріофаг λ ;

в) мієломні клітини;

г) розмір фрагмента чужорідної ДНК, який можна ввести у вектор не порушуючи його функцій;

д) і-РНК, яка синтезується на одній із ниток ДНК.

7. Реалізація генетичної інформації, закодованої в молекулі ДНК, шляхом транскрипції і трансляції називається:

а) реплікація;

б) експресія;

в) трансдукція;

г) трансфекція;

д) трансляція.

8. Білок, який інгібує транскрипцію одного або декількох генів, називається:

а) репресор;

б) індуктор;

в) регулятор;

г) атенуатор;

д) промотор.

9. Синтез РНК на ДНК-матриці називається:

- а) трансдукцією;
- б) сплайсингом;
- в) транскрипцією;
- г) трансфекція;
- д) трансляція.

10. Процес копіювання виділених або синтезованих генів чи генетичних структур в складі вектора називається:

- а) клонуванням генів;
- б) процесінгом;
- в) термінацією;
- г) трансдукція;
- д) генна мутація.

11. Рестриктази – ферменти, які володіють високою специфічністю до нуклеотидної послідовності основ в:

- а) і-РНК;
- б) м-РНК;
- в) ДНК;
- г) т-РНК;
- д) гя-РНК.

12. Нуклеотидна або амінокислотна послідовність в нуклеїнових кислотах або білках називають:

- а) сайт;
- б) алель;
- в) клон;
- г) геномом;
- д) цебридом.

13. Оперон – одиниця транскрипції і регуляції, яка складається із структурних і регуляторних генів і контролюючих елементів – присутні у:

- а) прокаріотичних організмах;
- б) еукаріотах;
- в) вірусах;
- г) віріонах;
- д) бактеріофагах.

14. До ферментного арсеналу, на якому базуються маніпуляції генетичної інженерії, відносяться:

- а) рестриктази, ліази, ДНК-полімерази;
- б) гідролази, трансферази, оксидоредуктази;
- в) оксидоредуктази, гідролази;
- г) рестриктази, гідролази;

д) ліази, оксидоредуктази.

15. Виділення окремих генів із природнього матеріалу в складі невеликих фрагментів ДНК було здійснено вперше:

- а) в 1868 р. Мішер і Тонігава;
- б) в 1969 р. Беквітом і Шапхро;
- в) в 1973 р. Балтімором і Мізутамі;
- г) в 1956 р. Нейфах і Газарян
- д) в 1962 р. Шабон і Бретнах

16. Вперше здійснено хімічний синтез гена, який функціонував у живій клітині в 1976 році:

- а) під керівництвом А. Корнберга;
- б) під керівництвом Корани;
- в) під керівництвом Берга;
- г) під керівництвом Беквітом;
- д) під керівництвом Балтімором.

17. В даний час для ферментативного одержання гена використовують:

- а) зворотні транскриптази;
- б) рестриктази;
- в) ендонуклеази;
- г) цитокініни;
- д) ДНК-лігази.

18. Некодуючі нуклеотидні послідовності в структурних генах еукаріот називають:

- а) інтронами;
- б) екзонами;
- в) індукторами;
- г) індукцибельними;
- д) промоторами.

19. Кодуючі нуклеотидні послідовності в структурних генах еукаріот, які видаляються із пре-РНК ферментативним шляхом у процесі сплайсингу, називаються:

- а) індукторами ;
- б) інтронами;
- в) екзонами;
- г) індукцибельними;
- д) промоторами.

20. Процес посттранскрипційного ферментативного процесу видалення з первинного РНК-транскрипту інтронів з наступним об'єднанням екзонів називається:

- а) сплайсингом;
- б) ампліфікацією;

- в) делецією;
- г) секвенуванням;
- д) скренінгу.

21. Обмін генетичним матеріалом між двома вихідними молекулами ДНК називають:

- а) гібридизацією;
- б) рекомбінацією;
- в) репарацією;
- г) реконструкцією;
- д) делецією.

22. Химерна ДНК це:

- а) дві копії однієї і тієї ж послідовності ДНК в складі одної молекули і знаходиться в протилежних орієнтаціях;
- б) одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотної транскрипції;
- в) штучно створена гібридна молекула ДНК, яка не має аналогів в природі;
- г) всі відповіді правильні;
- д) популяція клітин чи особин, що виникла нестатевим шляхом від одного спільного предка.

23. Плазміда це:

- а) довільний фрагмент гена;
- б) кільцева молекула ДНК здатна до стабільного не зв'язаного з хромосомами існування і автономної реплікації;
- в) ділянка ДНК між сайтами ініціації і термінації РНК-полімерази;
- г) молекула ДНК, яка здатна включатися в хромосому і утворювати ковалентно зв'язану структуру;
- д) одноланцюгова молекула ДНК.

24. Якщо позахромосомна молекула ДНК здатна включатися в хромосому і утворювати ковалентно зв'язану структуру, то вона називається:

- а) плазмідною;
- б) епісомною;
- в) космідною;
- г) цебридом;
- д) вектором.

25. Ділянка плазміди, що містить регуляторні елементи, які забезпечують процес незалежної реплікації, називається:

- а) репліконом;
- б) транспозоном;
- в) паліндромом;
- г) епісомною;

д) вектором.

26. Алель – це:

- а) різноманітність генів;
- б) однорідність генів;
- в) одна із двох (чи декількох) альтернативних форм гена;
- г) білок м'язових волокон;
- д) вірус, що спричиняє лізис актиноміцетів.

27. Амбер-кодон це триплет:

- а) УАГ;
- б) УГА;
- в) УАА;
- г) ААУ;
- д) УУГ.

28. Капсид це:

- а) внутрішня білкова оболонка вірусної частинки;
- б) зовнішня білкова оболонка вірусної частинки;
- в) ліпоїдна оболонка вірусної частинки;
- г) гліколіпідна оболонка вірусної частинки;
- д) мукопротеїдна оболонка вірусної частинки.

29. Охра-кодон це триплет:

- а) УАА;
- б) УГА;
- в) УАГ;
- г) ААУ;
- д) УУГ.

30. Трансляція – це:

- а) процес синтезу м-РНК;
- б) дозрівання м-РНК;
- в) процес синтезу білка на м-РНК;
- г) властивий прокаріотичним клітинам механізм трансляції мРНК, синтез якої ще не закінчився.
- д) штучна транскрипція у без клітинній системі з використанням очищеної молекули ДНК як матриці.

31. Спейсери – це:

- а) кодуючі послідовності між генами;
- б) некодуючі послідовності між генами;
- в) білки, які виконують регуляторну функцію;
- г) один із факторів транскрипції;
- д) місця локалізації гена на хромосомі

32. При повному кислотному гідролізі нуклеїнових кислот виникають усі перераховані речовини, крім:

- а) фосфорної кислоти;
- б) рибози;
- в) пуринових основ;
- г) аденозинтрифосфорної кислоти;
- д) дезоксирибози.

33. Який вид зв'язку існує між залишками пентози та фосфорної кислоти в нуклеотиді ?

- а) складноефірний;
- б) ангідридний;
- в) N-глікозидний;
- г) O-глікозидний;
- д) пептидний.

34. У процесі трансляції ініціюючою амінокислотою для більшості еукаріотичних білків стає:

- а) метіонін;
- б) аланін;
- в) серин;
- г) триптофан;
- д) лізин.

35. Які сполуки є субстратами в реакції біосинтезу ДНК за участі ДНК-полімерази?

- а) дАТФ, дЦТД, дГТФ, дТТФ;
- б) дАДФ, дЦДФ, дГДФ, дТДФ;
- в) АТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ;
- г) тільки дАТФ і дТТФ;
- д) дАТФ, дЦДФ, дГДФ, дТДФ.

36. Компонентами білоксинтезуючої системи рибосом є:

- а) всі відповіді вірні;
- б) рибосоми, мРНК, L-амінокислоти, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, регуляторні білки, коферменти;
- в) рибосоми, мРНК, L-амінокислоти, тРНК, регуляторні білки, коферменти;
- г) рибосоми, мРНК, L-амінокислоти, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, коферменти;
- д) мРНК, L-амінокислоти, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, регуляторні білки, коферменти.

37. Який фермент каталізує утворення пептидного зв'язку між першою /ініціюючою/ та другою амінокислотою, що зв'язані через свої тРНК з П- та А-сайтами рибосоми?

- а) аміноацил-мРНК-синтетаза;
- б) пептидилтрансфераза;
- в) амінопептидаза;
- г) РНК-полімераза;
- д) аміноацил-іРНК-синтетаза.

38. Вибрати вірні твердження:

- а) транскрипція – це процес біосинтезу ДНК на матриці РНК;
- б) копії мРНК, синтезовані в процесі транскрипції, переносяться в цитоплазму, на місце синтезу білка, де самі стають матрицями білкового синтезу;
- в) одиницю процесу транскрипції називають промотор;
- г) у процесі транскрипції синтезується тільки мРНК;
- д) всі твердження вірні.

39. Код має такі риси:

- а) код неспецифічний, кожний триплет кодує декілька амінокислот;
- б) код невіривняний;
- в) код перервний, між кодонами існують інтервали;
- г) код універсальний для вищих істот, відомим на наш час виключенням є мітохондрії;
- д) код неспецифічний, характерний кожному індивідууму.

40. Компонентами білоксинтезуючої системи рибосом є:

- а) рибосоми, мРНК, L-амінокислоти, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, регуляторні білки, коферменти;
- б) рибосоми, мРНК, L-амінокислоти, тРНК, регуляторні білки, коферменти;
- в) рибосоми, мРНК, L-амінокислоти, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, коферменти;
- г) мРНК, L-амінокислоти, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, регуляторні білки, коферменти;
- д) всі відповіді правильні.

Тестові питання з теми: “ Трансплантація ембріонів”

1. Перше повідомлення про трансплантацію ембріонів було зроблено:

- а) в 1890 році Хіном;
- б) в 1949 році Пінкусом і Гангом;
- в) в 1950 році Квасницьким;
- г) в 1956 році Плохінським;
- д) в 1945 році Дж. Беквіт.

2. Трансплантація ембріонів вперше була здійснена на:

- а) вівцематках;
- б) коровах;

- в) кролематках;
- г) козах;
- д) самках верблюдів.

3. Донор – це тварина (корова чи телиця):

- а) з високою відтворною здатністю;
- б) з високою племінною цінністю, від якої одержують ембріони;
- в) якій трансплантують ембріони;
- г) від якої одержують ембріони;
- д) з високою резистентністю.

4. Реципієнт – це корова або телиця:

- а) від якої одержують ембріони;
- б) якій трансплантують ембріони;
- в) з високою резистентністю;
- г) з низькою резистентністю.

5. Якщо як реципієнта використовують телиці, то вони повинні мати живу масу не менше:

- а) 150-200 кг;
- б) 200-250 кг;
- в) 250-350 кг;
- г) 350-380 кг;
- д) 390-420 кг.

6. Мінімальний вік телиць-реципієнтів повинен бути:

- а) 10-12 міс.;
- б) 12-14 міс.;
- в) 14-16 міс.;
- г) 16-18 міс.;
- д) 18-20 міс.

7. Для стимуляції суперовуляції використовують:

- а) глюкозу;
- б) ферментні препарати;
- в) гормональні препарати;
- г) вітаміни;
- д) ферментні препарати.

8. Оптимальним строком для викликання суперовуляції лактуючих корів чорно-рябої породи є період з:

- а) 10-го дня після отелу;
- б) 30-го дня після отелу;
- в) 60-го дня після отелу;
- г) 90-го дня після отелу;
- д) 50-го дня після отелу.

9. В даний час найбільш поширеним методом добування ембріонів є:

- а) після забою корови-донора;
- б) хірургічний;
- в) не хірургічний;
- г) механічний;
- д) за допомогою електромагнітних коливань.

10. Морула – це:

- а) органела клітини;
- б) ембріон в стадії 16-12 клітин;
- в) яйцеклітина;
- г) одна із стадій розвитку зародку багатоклітинних тварин, що виникає внаслідок дроблення яйцеклітини; передуює стадії бластули;
- д) одна з форм незернистих лейкоцитів – агранулоцитів.

11. Стадія бластоцисти – це:

- а) зародок у віці 5 діб;
- б) рання морула;
- в) зародок у віці 7-8 діб;
- г) нізня морула;
- д) зародок у віці 8-12 діб.

12. Оцінку біологічної повноцінності ембріонів проводять за:

- а) 3-х бальною системою;
- б) 4-х бальною системою;
- в) 5-ти бальною системою;
- г) 6-ти бальною системою;
- д) 7-ми бальною системою.

13. В основі відбору реципієнтів лежить:

- а) продуктивність;
- б) відсутність гінекологічних хвороб;
- в) племінні і породні якості;
- г) породні якості реципієнта;
- д) кількість введених ембріонів.

14. Основною умовою доброго приживання ембріонів є:

- а) синхронність прояву статевої охоти в донора і реципієнта;
- б) кількість введених ембріонів;
- в) породні якості донора;
- г) продуктивність;
- д) племінні і породні якості.

15. За хімічною природою простагландини відносяться до:

- а) похідних білків;
- б) похідних амінокислот;
- в) похідних вуглеводів;
- г) похідних жирних кислот;

д) похідні нуклеїнових кислот.

16. Кріоконсервацію ембріонів проводять при температурі:

- а) 0°C;
- б) -10°C;
- в) -30°C;
- г) -196°C;
- д) -172°C.

17. Як кріопротектор використовують:

- а) розчини білків, амінокислот, вітамінів;
- б) розчини солей лужних металів і амонійних солей;
- в) гліцерол, диметилсульфоксид, цукрозу, глюкозу, полівінілпіролідін;
- г) іммобілізовані ферменти;
- д) розчин білків, гормонів та ферментів.

18. Після пересадки ембріонів реципієнтів, для встановлення тільності, досліджують методом ректальної пальпації на:

- а) 10-й день;
- б) 30-й день;
- в) 60-й день;
- г) 50-й день;
- д) 90-й день.

Тестові питання з теми: “ Біотехнологія одержання ферментних препаратів”

1. За своєю хімічною природою ферменти є:

- а) поліцукориди;
- б) ліпіди;
- в) нуклеїнові кислоти;
- г) білки;
- д) олігоцукриди.

2. Ферменти класу оксидоредуктаз каталізують:

- а) реакції ізомеризації;
- б) гідролітичні процеси;
- в) окисно-відновні реакції;
- г) реакції синтезу, конденсації;
- д) синтетичні процеси.

3. До класу ліаз відносяться ферменти, що здійснюють:

- а) процеси синтезу і конденсації;
- б) приєднання груп до подвійних зв'язків, чи відщеплення груп з утворенням подвійних зв'язків;
- в) перенесення груп;

- г) окисно-відновні процеси;
- д) гідролітичні процеси.

4. Ферменти класу лігаз каталізують процеси:

- а) окисно-відновні;
- б) ізомеризації;
- в) синтезу і конденсації;
- г) гідролізу;

д) приєднання груп до подвійних зв'язків, чи відщеплення груп з утворенням подвійних зв'язків.

5. До класу трансфераз відносяться ферменти, які здійснюють:

- а) реакції ізомеризації;
- б) перенесення груп;
- в) процеси гідролізу;
- г) реакція синтезу і конденсації;

д) приєднання груп до подвійних зв'язків, чи відщеплення груп з утворенням подвійних зв'язків.

6. Для характеристики ферментних препаратів, які випускаються промисловістю, введена буквенна і цифрова індексація. Наприклад, Г20х препарат. Літера “Г” вказує:

- а) назва фермента;
- б) спосіб культивування продуцента;
- в) характеристика активності фермента;
- г) номенклатура фермента;
- д) концентрація фермента.

7. Виходячи з буквенно-цифрової індексації ферментного препарату П10х, цифра 10 показує:

- а) концентрацію фермента;
- б) активність;
- в) ступінь очистки;
- г) номенклатура фермента;
- д) спосіб культивування продуцента.

8. Амілолітичні ферменти (α -амілаза, β -амілаза, глюкоамілаза) відносяться до класу:

- а) трансфераз;
- б) ліаз;
- в) гідролаз.
- г) оксидоредуктаз;
- д) лігази.

9. Амілолітичні ферментні препарати амілорезину П20х, П10х, Пх різняться:

- а) способом культивування продуцента;

- б) ступенем очистки;
- в) агрегатним станом препарату;
- г) концентрацією препарату;
- д) консистенцією препарату.

10. Декстрини – продукти гідролізу:

- а) білків;
- б) жирів;
- в) крохмалю;
- г) клітковини;
- д) геміцелюлози.

11. Лактаза здійснює:

- а) синтез лактози;
- б) гідроліз лактози;
- в) осадження молочного цукру;
- г) синтез лактаму;
- д) гідроліз глікогену.

12. Декстераза каталізує процес:

- а) гідролізу декстринів;
- б) синтез крохмалю;
- в) гідролізу клітковини;
- г) гідролізу геміцелюлози;
- д) синтезу клітковини.

13. Індуктори біосинтезу ферментів – це речовини які:

- а) пригнічують біосинтез;
- б) є поживними середовищами для мікроорганізмів;
- в) стимулюють біосинтез ферментного білка;
- г) синтезовані монокультурою мікроорганізмів;
- д) забезпечують утворення активного комплексу (70 S рибосоми), до складу якого в прокаріот входять 30 S і 50 S субодиниці, мРНК та тРНК^{фмет}.

14. При поверхневому методі культивування продуцентів ферментних препаратів, вміст фермента складає:

- а) 0,1%;
- б) 1,0%;
- в) 0,01%;
- г) 0,5%;
- д) 10%.

15. При глибинному методі культивування продуцентів, вміст фермента складає:

- а) 1,0%;
- б) 0,1%;
- в) 2,0%;

- г) 0,5%;
- д) 0,05%.

16.Процес іммобілізації ферментів спрямований на:

- а) підвищення активності фермента;
- б) інгібування фермента;
- в) збереження і багаторазове використання ферментів;
- г) використання ферментів у промислових виробництвах;
- д) короткочасне підвищення активності фермента.

17.Хімічні методи іммобілізації базуються на:

- а) процесі адсорбції;
- б) створенні матричної полімерної напівпроникливої капсули навколо молекул фермента;
- в) утворенні ковалентних зв'язків білка з матрицею;
- г) зшивання молекул фермента між собою, наприклад за допомогою глутарового альдегіду;
- д) за рахунок Ван-дер-Вальської взаємодії.

18.У процесі іммобілізації ферментів ліпосоми відіграють роль:

- а) активатора фермента;
- б) матриці;
- в) інгібітора фермента;
- г) фактора пролонгуючої дії;
- д) супресора фермента.

19.За хімічною природою ліпосоми є:

- а) білки;
- б) ліпіди;
- в) вуглеводи;
- г) олігоцукридами;
- д) нуклеозидами.

20. α -амілаза каталізує:

- а) відщеплення залишків мальтози від кінців поліцукридного ланцюга;
- б) відщеплення залишків глюкози від кінців поліцукридного ланцюга;
- в) розщеплення довільних α -1,4-глюканових зв'язків;
- г) розщеплення довільних β -1,6-глюканових зв'язків;
- д) синтез поліцукридного ланцюга з глюкози.

21. β -амілаза – фермент, який каталізує:

- а) послідовне відщеплення залишків мальтози від кінців поліцукридного ланцюга;
- б) гідроліз любых α -1,4-глюканових зв'язків;
- в) послідовне відщеплення залишків глюкози від кінців поліцукридного ланцюга;
- г) розщеплення довільних β -1,6-глюканових зв'язків;

д) синтез поліцукридного ланцюга з глюкози.

22. Пепсин гідролізує пептидні зв'язки між:

- а) аргініном і лізином;
- б) ароматичними амінокислотами;
- в) довільними амінокислотами;
- г) оксиамінокислотами;
- д) гідроксиамінокислотами.

23. Трипсин здійснює гідроліз пептидних зв'язків між:

- а) аргініном і лізином;
- б) ароматичними амінокислотами;
- в) аланіном і гістидином;
- г) довільними амінокислотами;
- д) цистином і метіоїном.

24. Які речовини з перелічених нижче, відносять до поліамідних носіїв у процесі іммобілізації ферментів?

- а) моношар ліпиду на твердій поверхні;
- б) силікагель, активоване вугілля, графітова сажа;
- в) гепарин, кератин, колаген;
- г) целюлоза, декстран, альгінові кислоти та їх похідні;
- д) агар, агароза, хлорангідрид метакрилової кислоти.

25. Які речовини з перелічених нижче, відносять до неорганічних носіїв у процесі іммобілізації ферментів?

- а) найлон-6, капрон; N-вінілпіролідин;
- б) поліуретани, ультрагель типу АсА;
- в) желатин, кератин, колаген;
- г) макропористі кремнеземи, пірогенні кремнеземи, цеоліт;
- д) аеросил, цеоліт, активоване вугілля.

26. Які речовини з перелічених нижче, відносять до білкових носіїв у процесі іммобілізації ферментів?

- а) агароза, агар, декстран;
- б) хітозан, хітин, декстран;
- в) желатин, кератин, колаген;
- г) гепарин, декстран, альгінові кислоти та їх похідні;
- д) хітозан, хітин, гепарин.

27. Коли і ким був вперше застосований метод ковалентної іммобілізації?

- а) в 1862 році Дж.Нельсоном і Е.Гриффином;
- б) в 1949 році С. Пінкусом і М.Гангом;
- в) в 1950 році О.Хіннікером і Д.Бестом;
- г) в 1956 році Г.Манским і Г.Фоттом;
- д) в 1953 році Н. Грубхофером і Д. Шлейтом.

28. Фізичний метод іммобілізації ферментів здійснюється:

- а) за участю ковалентних зв'язків між ферментом і матрицею;
- б) адсорбції на нерозчинних носіях та методу включення в структуру носія без ковалентних зв'язків;
- в) з використанням напівпрониклих оболонок (мембран);
- г) з використанням систем двофазного типу;
- д) включення ферменту в ліпосоми.

29. Хімічний метод іммобілізації ферментів здійснюється:

- а) включення ферменту в ліпосоми;
- б) з використанням напівпрониклих оболонок (мембран);
- в) за участю ковалентних зв'язків між ферментом і матрицею;
- г) адсорбції на нерозчинних носіях та методу включення в структуру носія без ковалентних зв'язків;
- д) з використанням систем двофазного типу.

30. За хімічною природою ліпосоми є:

- а) білки;
- б) ліпіди;
- в) вуглеводи;
- г) олігоцукридами;
- д) нуклеозидами.

Рекомендована література

1. Никифорова В. В. Кременчук: ПП Щербатих О.В., Галузі сучасної біотехнології. 2021 184 с
2. Галузі сучасної біотехнології /Підручник за редакцією: Никифоров В. В. Кременчук: ПП Щербатих О.В, 2021. 184 с.
3. Захаренко М. О., Яремчук О. С., Шевченко Л. В. Гігієна та біоферментація побічних продуктів тваринництва: монографія. Київ: Центр учбової літератури, 2017. 536 с.
- 4 Носенко Ю. Біогаз – реальна альтернатива природному газу? URL: <http://www.agro-business.com.ua/ideii-i-trendy/3701-biogaz-realna-alternatyva-pryrodnomu-gazu.html>
5. Екологічна біотехнологія / Швед О. В. та ін.: навч. посіб. у двох книгах. Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2018. 424 с.
6. Альтернативна поновлювана енергетика та біоконверсія: навчальний посібник / [уклад. Буцяк В.І., Шемедюк Н.П., Ромашко І.С., Горчин С.В., Двилюк І.І.]. Львів: ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького, 2023. 293 с.
7. Усенко С.О., Васильєва О.О. Біотехнологія та відтворення тварин: навч. посіб. Полтава: РВВ ПДАА, 2020. 107 с.
8. English for Biology and Bioengineering: навч. посібник / О. Поліщук. К.: ЦП «Компринт», 2017. 200 с.
9. Основи біотехнології. Буцяк В.І., Колотницький А.Г., Буцяк Г.А. навч. посіб. Львів: Тріада плюс, 2011, 395 с.
10. Біотехнологія: навч. посіб. / О. І. Юлевич, та ін.С. Миколаїв: МДАУ, 2012. 476 с
11. Butsyak A., Butsyak V., Shved O., Hubrii Z. Analysis of the adsorbents use for local reduction of toxic load with heavy metal// Health and nanobio-technology. Human health: realities and prospects monographic series, 2020. V. 5. P. 88-104.
12. Петрух, І.М. Буцяк В.І. Сімонов М.Р.. Протеїновий обмін та ензимна активність у високопродуктивних молочних корів за метаболічних порушень/ НТБ ДНДКІ ветпрепаратів і кормових добавок і Інституту біології тварин.Вип.20, №1. Львів, 2019. С.14-21.
13. Альтернативне використання субстратів опалого листя у вермикультивуванні. Буцяк Г.А., Гавриляк В.В., Швед О.В., Буцяк В.І. *Вісник НУ "Львівська Політехніка"*, 2018. V.1, № 2. С.74–79.
14. Акименко Л.І., Гордієнко О.І., Тиндик В.С. Біотехнологія конструювання, виробництва та контролю якості ветеринарних

препаратів та лікарських засобів. Ветеринарна біотехнологія №32(1), 2018. С.34-43.

15. Шемедюк Н. П. Клітинна інженерія: навч. посіб. Львів, 2018. 130 с.

16. Буцяк А.А., Буцяк В.І., Калин Б.М. Отримання та використання вермікомпосту (біогумусу) з метою покращення поживного режиму ґрунту. Екологічні науки, 2022. № 5(44). С.116-120. DOI <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2022.eco.5-44.16>.

17. Рибальченко Т.В., Кузнецова Г.М., Держинський М.Е., Механізми клітинної диференціації. Київ: ВПЦ "Київський університет", 2017. 383 с.

18. Стівбурові клітини у ветеринарній медицині. Том II. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування стівбурових клітин. Монографія /Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О. Вид. ТОВ ЦП «Компринт». 2017. 280 с.

19. [dspace.mnau.edu.ua > bitstream > Osnovy_biotekhnolohiyi_tvaryn](https://dspace.mnau.edu.ua/bitstream/Osnovy_biotekhnolohiyi_tvaryn)

20. [socrates.vsau.org > html > cards > getfile.php](https://socrates.vsau.org/html/cards/getfile.php)

21. [repo.btu.kharkov.ua > materialy-MNPK_SIAHV_2021-455-457](https://repo.btu.kharkov.ua/materialy-MNPK_SIAHV_2021-455-457)

22. ocrates.vsau.org/b04213/literat/view/getfile/667395001293174113.pdf

23. rgt.org.ua/index.php?option=com_content&view=article...

ЗМІСТ

Передмова	3
РОЗДІЛ 1. Теоритичні основи дисципліни “Біотехнологія”	4
Клітинна інженерія	5
Генетична інженерія	8
Одержання і трансплантація ембріонів	15
Біотехнологія біологічно активних речовин. Біотехнологія одержання амінокислот	19
Біотехнологія мікробного синтезу білка	19
Мікробіологічний синтез вітамінів	20
Біосинтез гормонів	20
Біотехнологія одержання ферментних препаратів	21
Біотехнологія одержання антибіотиків	22
РОЗДІЛ 2. Лабораторно-практичні основи біотехнології	24
Тема 1. Культури рослинних і тваринних клітин.	
Лабораторна робота №1. Приготування поживних середовищ для культивування рослинних клітин.	25
Лабораторна робота №2. Отримання рослинних суспензійних культур.	30
Лабораторне заняття №3. Культивування тваринних клітин	33
Тема 2. Одержання гонадотропіну та трансплантація ембріонів.	
Лабораторне заняття №4. Одержання гонадотропіну із сироватки жеребної кобили.	36
Тема 3. Молекулярно-біологічні основи одержання монозиготних і химерних тварин. Лабораторне заняття №5. Одержання монозиготних близнят та химерних тварин методами біотехнології.	38
Тема 4. Імобілізація глюкоамілази і вивчення активності іммобілізованого і вільного ферменту. Лабораторне заняття № 6. Визначення активності вільного та іммобілізованого на цеоліті ферменту глюкоамілази.	42
Тема 5. Біоконверсія відходів сільськогосподарського виробництва та біотехнологія одержання біогазу. Лабораторне заняття № 7. Розрахунки основних параметрів біотехнологічного процесу переробки гнойової маси в біогаз	45
Перелік питань для самостійного вивчення з дисципліни “Біотехнологія”	58
Тестові питання з дисципліни “Біотехнологія”	61
Рекомендована література	84