Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

А. В. Вишневец, В. Ф. Соболева, Т. В. Видасова

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие для студентов
биотехнологического факультета
по специальности 1 – 74 03 01 «Зоотехния»

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Витебск
ВГАВМ
2019

УДК 573.6.086.83:636(075.8)
ББК 45.318я73
В55

Рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины»
от 20.11.2018 г. (протокол № 4)

Авторы:
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А. В. Вишневец;*
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *В. Ф. Соболева;*
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Т. В. Видасова*

Рецензенты:
кандидат ветеринарных наук, доцент *Р. Б. Корочкин*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Ю. В. Шамич*

Вишневец, А. В.

В55 Основы биотехнологии : учеб. - метод. пособие для студентов биотехнологического факультета по специальности 1 – 74 03 01 «Зоотехния» / А. В. Вишневец, В. Ф. Соболева, Т. В. Видасова. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 72 с.

Учебно-методическое пособие написано в соответствии с учебным планом для высших учебных заведений по специальности 1 – 74 03 01 «Зоотехния». Содержит сведения о теоретических основах биотехнологии и методики выполнения практических занятий по конкретным темам.

УДК 573.6.086.83:636(075.8)
ББК 45.318я73

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2019

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

СОДЕРЖАНИЕ

Введение …… 4

Тема 1. Понятие о биотехнологии. Проблемы и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии в Республике Беларусь 6

Тема 2. Генная инженерия. Технология получения рекомбинантной ДНК. Методы получения и клонирования генов. Ферменты, применяемые в технологии рекомбинантных ДНК. Векторы и их свойства. Полимеразная цепная реакция ……..… 9

Тема 3. Биотехнология получения инсулина, гормона роста, интерферона …… 15

Тема 4. Получение трансгенных животных. Биотехнология и биобезопасность …… 20

Тема 5. Клеточная инженерия. Культура клеток. Получение тканей и органов *in vitro*. Стволовые клетки. Свойства микроорганизмов, методы селекции промышленных штаммов микроорганизмов …… 26

Тема 6. Гибридизация соматических клеток и получение гибридом … 29

Тема 7. Использование биотехнологических методов для получения клонированных и химерных животных ……..... 31

Тема 8. Биотехнологический процесс получения антибиотиков. Применение антибиотиков в животноводстве ……..... 35

Тема 9. Производство аминокислот. Синтез белка растительными и животными организмами. Биотехнология получения белка одноклеточных организмов, микробного белка, белковых концентратов из растений. Производство кормовых дрожжей и кормовых витаминных препаратов ……...…… 37

Тема 10. Биотехнологическая трансформация стероидных гормонов. Использование стероидных и других гормонов в естественном контроле репродуктивной функции …… 47

Тема 11. Ферментные препараты, их производство и применение в животноводстве. Иммобилизованные ферменты и способы их получения …… 52

Тема 12. Применение пробиотиков, пребиотиков, гербиотиков и симбиотиков в животноводстве …….. 59

Тема 13. Утилизация навоза и получение биогаза. Типы и принципы работы биогазовых установок ……..……... 63

Список рекомендуемой литературы …… 69

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология – это наука, занимающаяся разработкой методов и технологий производства, транспортировки, хранения и переработки сельскохозяйственной продукции с использованием животных, растений и микроорганизмов в естественных и искусственных условиях.

Биотехнология дает знания о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) животных, растений и микроорганизмов в целях расширения их разнообразия, интенсификации производства и получения новых видов различных продуктов.

Цель дисциплины: дать студенту теоретические знания о роли генетического конструирования – как современном методе селекции организмов, о сущности биологических систем, процессов и способах применения их в животноводстве.

В результате изучения дисциплины «Основы генетической инженерии и биотехнологии» студент **должен**:

знать:

- принципы создания и использования генетически модифицированных клеток и высокопродуктивных штаммов микроорганизмов для получения биологически активных веществ, ферментов, кормовых добавок и высококачественных продуктов, иммунологических материалов;
- способы выделения клоновых культур и клонирование животных;
- методы получения и использования ооцитов и стволовых клеток, способы разделения сперматозоидов по половым хромосомам;
- методы секвенирования нуклеотидов в очищенных фрагментах ДНК и конструирования рекомбинантных ДНК, введения генов в зародышевые клетки и получения трансгенных животных;
- биотехнологические способы производства экологически чистых источников энергии, антибиотиков, гормонов, аминокислот и белка одноклеточных организмов, продуктов различного назначения;
- получение и использование стероидных гормонов и ферментных препаратов в ветеринарной медицине и животноводстве.

уметь:

- рационально использовать получаемые биотехнологическим путем кормовые белковые и ферментные препараты, организовать в хозяйстве простейшую переработку корма для обогащения белком одноклеточных организмов;
- использовать другие доступные биотехнологические методы для повышения молочной и мясной продуктивности, плодовитости животных и защиты окружающей среды.

владеть:

- способностью определить наиболее подходящий продукт, получаемый биотехнологическим путем, для улучшения продуктивности и репродуктивной способности животных или в терапевтических целях и для повышения общей резистентности организма;

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

- умением грамотно оценить возможности сельскохозяйственной организации в использовании современных методов применения и утилизации биомассы, растительных отходов и навоза для получения биогаза, а также других источников энергии (биотоплива и др.);

- способностью проведения экспериментов в различных технологических условиях, методами обработки результатов исследований, системным и сравнительным анализом.

В соответствии с учебным планом учреждения высшего образования по специальности 1 – 74 03 01 «Зоотехния» для изучения дисциплины «Основы генетической инженерии и биотехнологии» отводится 130 часов, из них 68 часов аудиторных. Распределение аудиторного времени по видам занятий: лекции – 16 часов, ЛПЗ – 48 часов, самостоятельная работа студентов – 2 часа. Курс – 2, 4 семестр.

По сокращенному сроку получения высшего образования для изучения дисциплины отводится 130 часов, из 50 часов аудиторных. Распределение аудиторного времени по видам занятий: лекции – 16 часов, ЛПЗ – 32 часов, самостоятельная работа студентов – 2 часа. Курс – 2, 4 семестр.

Форма текущей аттестации – зачет (4 зачетные единицы). Форма получения высшего образования – очная.

Учебно-методическое пособие «Основы биотехнологии» предназначено для подготовки к лабораторно-практическим занятиям.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Тема 1. ПОНЯТИЕ О БИОТЕХНОЛОГИИ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

***Цель занятия*:** изучить роль биотехнологии в ускорении научно-технического прогресса, ознакомиться с основными направлениями и перспективами развития в Республике Беларусь.

Контрольные вопросы:

1. Понятие о биотехнологии, история ее возникновения и развития.
2. Основные направления и задачи биотехнологии, связь с другими дисциплинами.
3. Достижения биотехнологии в сельском хозяйстве и ветеринарной медицине.
4. Развитие биотехнологии в Республике Беларусь.

Теоретическая часть

Биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) животных, растений и микроорганизмов в целях расширения их разнообразия, интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения. Это наука и отрасль производства, основанная на использовании биологических объектов и систем.

Основные направления биотехнологии:

1. Генная инженерия. Это область молекулярной генетики, которая разрабатывает методы конструирования новых генетических программ.

2. Клеточная инженерия. Получение клеток нового типа, гибридомная технология, конструирование генетически новых объектов путем клеточной гибридизации и введения чужеродного генетического материала.

3. Эмбриогенетическая инженерия. Это активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на ранних этапах онтогенеза. Перестройка генома – это реконструкция эмбрионов путем клонирования, слияния или инъекции в их ядра чужеродной ДНК.

Основные направления эмбриогенетической инженерии:

а) клонирование животных;

б) получение генетических химер;

в) получение трансгенных животных;

г) трансплантация эмбрионов.

4. Традиционная биотехнология. Использование анаэробных процессов для производства вина, силоса, квашения, получение молочнокислых продуктов, спирта и т. д.

5. Инженерная энзимология. Применение микробиологических, физико-химических методов для производства ферментов – специфических катализаторов белковой природы.

Биотехнология тесно связана со многими науками: биологической и биоорганической химией, молекулярной биологией, генетикой, микробиологией, иммунологией, физиологией животных и человека, цитологией и др.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 1. Изучить использование биотехнологии в разных отраслях (таблица 1).

Таблица 1 – Использование биотехнологии в разных отраслях

Отрасли	Область применения
Сельское хозяйство	Производство белково-витаминных концентратов. Селекция, клонирование и генетическая инженерия животных и растений. Производство антибиотиков для лечения животных и птицы. Производство вакцин. Производство биоинсектицидов. Получение гормонов и других стимуляторов роста.
Производство химических веществ и соединений	Производство органических кислот. Получение витаминов, антибиотиков и др. Использование ферментов в составе СМС.
Контроль за состоянием окружающей среды	Улучшение методов тестирования и мониторинга загрязнений окружающей среды. Использование микроорганизмов для переработки сельскохозяйственных, бытовых и промышленных отходов.
Медицина	Использование ферментов в диагностике. Использование микроорганизмов при создании и модификации сложных лекарственных средств. Разработка новых методов получения антибиотиков, гормонов, интерферона. Применение ферментов и штаммов микроорганизмов.
Энергетика	Производство биогаза. Производство этанола.
Пищевая промышленность	Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов. Применение пищевых добавок, полученных с помощью микроорганизмов. Использование белка одноклеточных организмов. Применение ферментов. Совершенствование спиртового и молочнокислого брожения.

Задание 2. Изучить классификацию биотехнологических производств.

Классификация биотехнологических производств.

1. Производства, осуществляющие процессы переработки продуктов питания и сельскохозяйственного сырья, в которых не производится выращивание больших масс микроорганизмов или извлечение продуктов метаболизма (хлебопечение, производство сыра, напитков, силосование кормов и т. д.). Микроорганизмы используются в небольшом количестве лишь на одной из стадий технологического процесса.

2. Бродильные производства, с помощью которых получают некоторые органические кислоты, растворители и энергетическое сырье (спирт, ацетон, бута-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

нол и т. д.). При этом микроорганизмы можно культивировать в нестерильных условиях.

3. Биотехнологические производства со специальным оборудованием и технологией, в которых микроорганизмы используются в производственных условиях для обработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, очистки воды, почвы от загрязнений.

4. Производства, осуществляющие получение в промышленных условиях биомассы для кормовых и технологических целей. Процессы происходят в нестерильных условиях, но требуют специфического оборудования в зависимости от сырья.

5. Производства, занимающиеся получением микробной и клеточной биомассы в асептических условиях для растениеводства, пищевых целей (бактериальные удобрения и пестициды, пищевой белок). Эти производства отличаются сложностью аппаратурного оформления процессов выращивания и очистки, что оправдывает выделение их в самостоятельную группу.

6. Получение для нужд промышленности, сельского хозяйства и медицины микробных метаболитов сложной органической структуры, большинство из которых обладают физиологической активностью (антибиотики, витамины, ферменты, кровезаменители, некоторые полимеры, аминокислоты, полисахариды и т. п.). Эти производства осуществляются в асептических условиях выращивания, при этом необходимо специальное оборудование и технологии для выделения и очистки целевого продукта.

7. Производства по использованию иммобилизованных ферментов и клеточных систем.

8. Производства, занимающиеся трансформацией органических веществ (получение стереоселективных сложных органических молекул).

9. Культивирование клеток многоклеточных организмов. Производство моноклональных антител (иммунная биотехнология). Клональное размножение важнейших сельскохозяйственных растений с помощью культур клеток и тканей, методов клеточной селекции, получение гаплоидов и гибридизация соматических клеток для создания исходных форм и сортов; оздоровление посадочного материала.

10. Производства по применению микробиологических процессов в традиционно небиологических областях техники, например для выщелачивания металлов, удаления метана из шахт, обогащения руд, повышения нефтеотдачи пластов и т. д.

11. Применение методов генетической инженерии для получения новых микроорганизмов и клеток с заданными свойствами.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 3. Изучить перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием (рисунок 1).

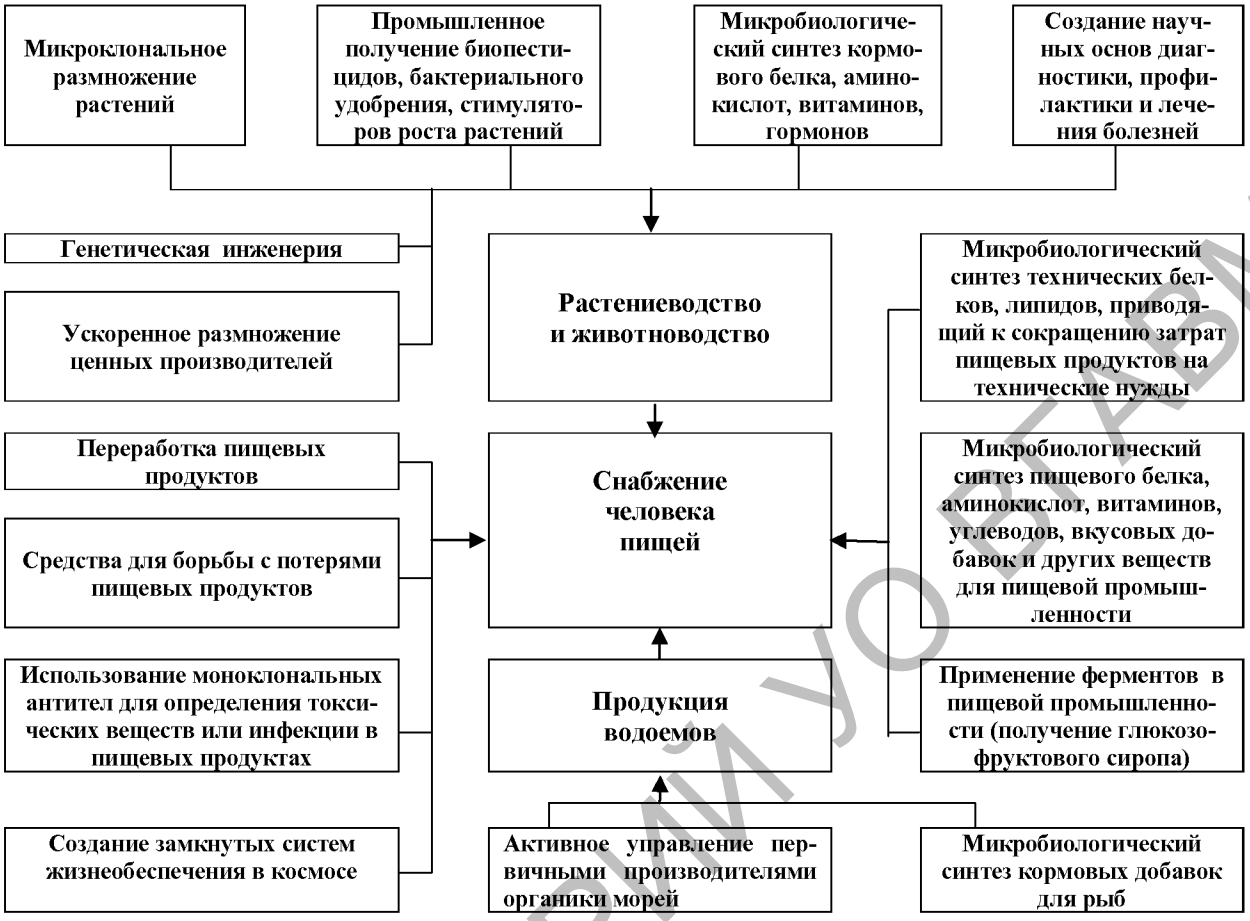


Рисунок 1 - Перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Тема 2. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ. ФЕРМЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК. ВЕКТОРЫ И ИХ СВОЙСТВА. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

1-е занятие. Методы получения и клонирования генов.

***Цель занятия*:** изучить основные задачи генной инженерии, узнать способы получения генов, ознакомиться с ферментами и векторами, применяемыми в технологии получения рекомбинантных ДНК.

Контрольные вопросы:

1. Понятие о генной инженерии, история развития.
2. Основные направления и задачи генной инженерии.

3. Получение генов различными способами. Методы введения генов в бактериальные клетки.
4. Векторы и их использование для переноса генетического материала.
5. Рестриктазы и их значение в генной инженерии.

Теоретическая часть

Генетическая инженерия – это конструирование in vitro функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК) и наследственно измененных организмов.

Генную инженерию используют для изучения структуры, функций и регуляции генов, также для изучения структуры хромосом. Датой возникновения генной инженерии считается 1972 год, когда в США П. Берг с сотрудниками создали первую рекомбинантную молекулу ДНК, состоящую из фрагмента ДНК обезьяньего вируса SV-40 и бактериофага λ с галактозным опероном *E. coli*.

Таблица 2 - История развития генетической инженерии

Дата	Событие
1	2
1917	Карл Эреки ввел термин «биотехнология»
1920	Ф. Лайбах впервые использовал метод выделения эмбрионов для получения гибридов
1924	Г.Д. Карпеченко скрестил редьку и капусту и впервые получил фертильное потомство от растений разных родов
1936	Внедрен в практику биореактор (ферментер и аппарат культивирования)
1943	Произведен пенициллин в промышленном масштабе
1944	Освальд Эвери, Колин Маклауд и Маклин Маккарти показали, что генетический материал представлен ДНК
1952	У. Хайс описал плазмиду как внехромосомный фактор наследственности
1953	Джеймс Уотсон и Френсис Крик определили структуру молекулы ДНК
1961	Учрежден журнал «Biotechnology and Bioengineering»
1960	Северо Очоа и Артур Корнберг выделили фермент ДПК-полимеразу
1961-1966	Расшифрован генетический код
1962	Хар Гобинд Корана синтезировал химическим способом функциональный ген. Дж. Гердон осуществил первое клонирование животного организма (лягушка)
1970	Выделена первая рестриктирующая эндонуклеаза
1972	Х. Г. Корана и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК
1973	Стенли Коэн и Герберт Бойер положили начало технологии рекомбинантных ДНК, пересадили ген лягушки в бактериальную клетку
1975	Георг Келер и Цезарь Мильштейн описали получение моноклональных антител (Нобелевская премия 1984 г.)
1976	Изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК
1976	Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК
1978	Фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью E.coli
1981	Разрешен к применению в США первый диагностический набор моноклональных антител
1982	Разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Продолжение таблицы 2

1	2
1983	Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды
1983	Получено первое ГМ растение (табак)
1986	Кэри Мюллис разработал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)(Нобелевская премия 1993 г.)
1990	В США утвержден план испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека
1994-1995	Опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека
1996	Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд долл.
1997	Клонировано первое млекопитающее из дифференцированной соматической клетки
2000	Первое полное картирование генома растения *Arabidopsis thaliana*
2003	Расшифрован геном человека, содержащий приблизительно 30 тысяч генов

Способы получения генов:

1) рестрикционный (выделение генов из ДНК);
2) химический синтез;
3) ферментативный синтез;
4) химико-ферментативный синтез.

Методы введения генов в бактериальные клетки:

1) трансформация;
2) трансфекция;
3) трансдукция.

Рестриктирующие эндонуклеазы (*рестриктазы*) – это ферменты, способные разрезать молекулу ДНК в строго определенных местах с образованием липких концов. Рестриктазы были открыты в 1968 году.

Например, рестриктаза *E. coli* под названием *EcoRI* узнает последовательность и разрезает ее на участках, помеченных стрелками. В результате, кольцевая молекула ДНК станет линейной. По краям молекулы образуются липкие концы, с одной стороны – ААТТ, с другой – ТТАА. При наличии липких концов, молекула ДНК может опять замкнуться в кольцо. Рестриктазы могут узнавать различные последовательности нуклеотидов.

-- Г ↓ ААТТ Ц –
--Ц ТТАА ↑ Г --

Соединение разрывов цепей ДНК после обработки рестриктазами производится ферментом *лигазой.*

Векторы и их использование для переноса генетического материала

Вектор – это молекулы ДНК, которые способны переносить чужеродные гены и обеспечивать их репликацию в клетке – хозяине.

Типы векторов:

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

1. Векторы для клонирования.
2. Экспрессионные векторы.
3. Векторы для трансформации.

Общие свойства вектора:

1. Должен иметь свойство репликона.

2. Должен иметь сайты рестрикции, т.е. участки узнавания для рестриктаз. При этом места разрезания и введения другой ДНК не должны влиять на репликацию вектора.

3. Должен иметь один или несколько маркирующих генов, по которым его можно обнаружить.

4. Должен содержать специфические для данной клетки промоторы и терминаторы транскрипции.

Задание 1. Заполнить таблицу 3.

Таблица 3 – Основные этапы развития генетической инженерии

Год	Автор	Содержание открытия

Задание 2. Зарисовать таблицу 4.

Таблица 4 – Некоторые рестриктазы, образующие фрагменты с липкими концами

Фермент	Узнаваемый участок (5'…3')	Могут соединяться с фрагментами, образованными
Ava I	Ц↓(Пу) ЦГ (Пи)Г	*Sal I Xho I Xma I*
Bam HI	Г↓ГАТЦЦ	*BgI II Mbo I*
BgI II	А↓ГАТЦТ	*Bam HI Mbo I*
Eco RI	Г↓ААТТЦ	
Eco RII	↓ЦЦАГГ	
*Eco RI**	↓ААТТ	*Eco RI*
Hpa II		*Tag I*
Sal		*Ava I Xho I*
Tag I		*Hpa II*
Xho I		*Ava I SaI I*
Xma I		*Ava I*

Задание 3. Получить ген молекулы белка ……., состоящего из последовательности аминокислот (по индивидуальным заданиям).

Задание 4. Найти рестриктазу из таблицы 4, которая может разрезать молекулу ДНК в определенной точке и указать, на каком участке ДНК данная рестриктаза произведет разрыв (по индивидуальным заданиям).

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

2-е занятие. Технология получения рекомбинантной ДНК. Полимеразная цепная реакция.

***Цель занятия*:** ознакомиться с технологией получения рекомбинантной молекулы ДНК, изучить метод электрофорезного анализа ДНК в агаровом геле и основные этапы полимеразной цепной реакции.

Контрольные вопросы:

1. Технология получения рекомбинантной ДНК (ферментативный синтез).
2. Метод электрофорезного анализа ДНК в агаровом геле.
3. Метод блот-гибридизации ДНК по Саузерну.
4. Секвенирование ДНК.
5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее применение в практике.

Теоретическая часть

Рекомбинантные ДНК – это искусственно созданные молекулы ДНК, включающие ген и вектор.

Ферментативный способ получения рекомбинантной ДНК

Система для ферментативного синтеза генов представляет собой раствор, в котором содержатся все *4 нуклеотида*, *ионы магния*, *фермент обратная транскриптаза* и *матричная РНК*, на которой будет синтезироваться ДНК. Для конструирования рекомбинантной ДНК необходим ряд ферментов:

1. *Рестрикционные эндонуклеазы* – находят и разрезают молекулы ДНК в сайтах с определенными последовательностями, которые узнает только определенная рестриктаза.

2. *Обратная транскриптаза (ревертаза)*, которая осуществляет синтез ДНК на матрице РНК.

3. *ДНК-полимераза* – катализирует синтез ДНК на матрице ДНК.

4. *ДНК-лигаза* – склеивает молекулы ДНК, образуя связи между дезоксирибофосфатами нуклеотидов.

5. *Терминальная трансфераза* – досинтезирует к концам двойной спирали ДНК пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды.

6. *Эндонуклеаза фага* – отщепляет однонитчатые концы 3′ - конца двойной спирали ДНК.

7. *Нуклеаза* – сокращает двойную спираль ДНК с обоих концов.

Полученный ген не содержит интронов, промоторов и других элементов, регулирующих генную активность. Такие гены подключаются к промоторам прокариот и экспрессируются в прокариотах.

Для введения рекомбинантной ДНК в клетку, клетка должна быть компетентной, компетентности можно добиться при использовании $CaCl_2$ и теплового удара. Для облегчения проникновения ДНК в клетку бактерий, их обрабатывают *лизоцимом*, который гидролизирует мукопептиды, входящие в состав клеточной стенки бактерий. Клетки эукариот обрабатывают ферментами, которые разрушают полисахариды оболочки. Также для облегчения проникновения ДНК в клетку эукариот используют *диэтиламиноэтилдекстран* и *полиэтиленгликоль*. Клетки дрожжей обрабатывают солями лития или электроимпульсами. Введе-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ние рекомбинантной ДНК в клетку называется **трансформацией**. Организмы, содержащие фрагменты чужеродной ДНК, называют **трансгенными**.

Задание 1. Зарисовать схему получения рекомбинантной ДНК и записать основные этапы.

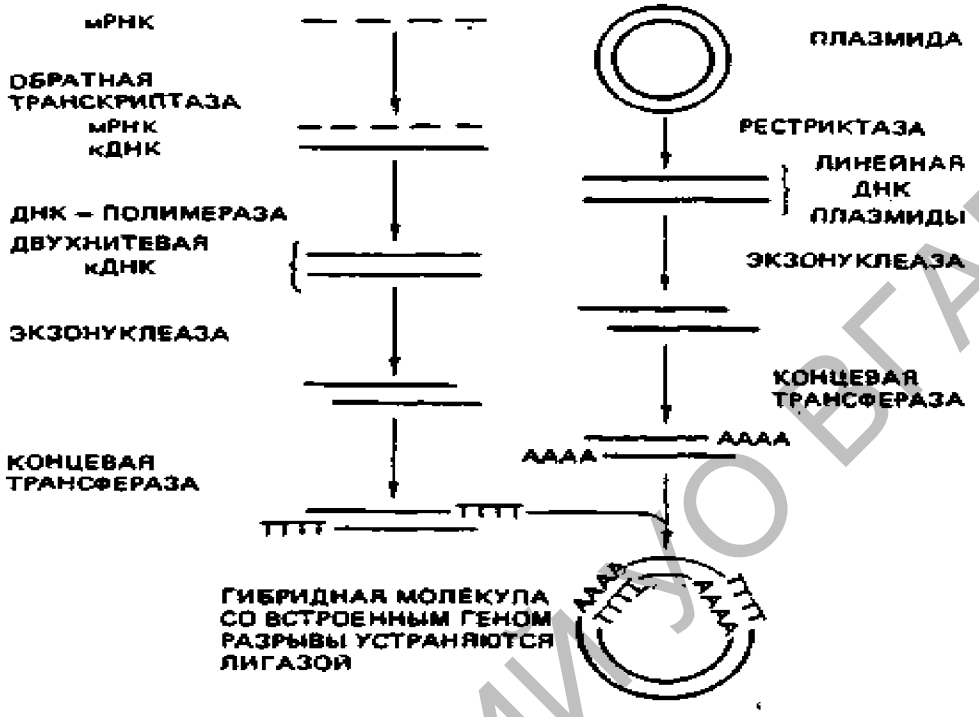


Рисунок 2 – Схема ферментативного синтеза гена (по В.Л. Петухову и др.)

Метод электрофорезного анализа ДНК в агаровом геле:

1. ДНК обрабатывают *рестриктазами* и помещают в лунки застывшего агарового геля, который затем помещается в камеру для электрофореза.
2. Под действием электрического поля фрагменты ДНК начинают перемещаться в геле, скорость их перемещения зависит от длины фрагмента. Короткие фрагменты движутся быстрее, при этом цепочки ДНК различной длины отделяются друг от друга, но не повреждаются.
3. После электрофореза гель окрашивают красителем *этидиум бромидом*, который связывается с ДНК.
4. Гель помещают под ультрафиолетовый свет и на нем хорошо видны окрашенные в красный цвет светящиеся фракции ДНК.

В результате электрофорез позволяет разделить, а затем извлечь любые фрагменты ДНК в чистом виде.

Секвенирование ДНК – это определение последовательности нуклеотидов в фрагменте ДНК. В результате секвенирования определяется также аминокислотная последовательность белка в соответствии с нуклеотидной последовательностью в соответствующем гене.

Используются 2 метода:

1) *химическое секвенирование*;

2) *ферментативное секвенирование* путем терминации цепи.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Полимеразная цепная реакция – современный метод молекулярной биологии, который разработан ***Кэри Мюллисом*** (Нобелевская премия в 1993 году). Использование ПЦР позволяет *амплифицировать* (размножать) ДНК или ее фрагменты *in vitro*, увеличивая число копий в миллионы раз за несколько часов.

Полимеразно-цепная реакция протекает в 3 стадии:

1. Денатурация. Смесь, в которой содержится ДНК, нагревают до температуры 90° С. В течение 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК и образуется 2 одноцепочечных ДНК из одной двухцепочечной.

2. Гибридизация праймеров. Температуру снижают до 50° С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами в течение 30 секунд.

3. *Полимеризация*. Смесь с ДНК нагревают до температуры 70° С. При этом Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3′-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Процесс протекает 90 секунд и в результате количество ДНК удваивается. Фермент Tag-полимераза был выделен из термофильных бактерий и отличается устойчивостью к высоким температурам. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК возрастает в 10^6. ПЦР-реакция происходит в специальном приборе – *амплификаторе*.

Этот метод позволяет получать точные данные по структуре генов и фрагментов ДНК при наличии минимального количества материала, используется для диагностики наследственных болезней человека, при дактилоскопии и идентификации индивидуумов, для направленного получения мутаций.

Задание 2. Решение задач по генной инженерии.

Задание 3. Просмотр и обсуждение видеофильма по генной инженерии.

Тема 3. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНСУЛИНА, ГОРМОНА РОСТА, ИНТЕРФЕРОНА

Цель занятия: изучить методы получения инсулина, гормона роста, интерферона.

Контрольные вопросы:

1. Применение инсулина в медицине и основные этапы получения инсулина.
2. Использование гормона роста (*соматотропина*) в селекции крупного рогатого скота.
3. Технология получения соматотропина.
4. Получение интерферона.

Теоретическая часть

Получение инсулина

Инсулин – гормон поджелудочной железы, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий нормальный уровень глюкозы в крови. Инсулин был впервые выделен из поджелудочной железы быка в 1921 г. Ф Бантингом и

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Ч. Бестом. Инсулин – небольшой глобулярный белок, содержащий 51 аминокислотный остаток и состоящий из двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками. Полипептидная цепь А содержит 21 аминокислотный остаток, а цепь В – 30 аминокислотных остатков, молекулярная масса инсулина – 5,7 кDa.

Основные методы получения инсулина:

1. Экстракция из поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней. Для получения 100 г кристаллического инсулина необходимо 800-1000 г исходного сырья. Бычий и свиной инсулины наиболее близкие к инсулину человека по своему строению и аминокислотной последовательности и проявляют в организме человека активность, сравнимую с инсулином человека. Долгое время для лечения пациентов, страдающих сахарным диабетом I типа, применяли инсулины быка или свиньи. Однако через некоторое время в организме человека начинают накапливаться антитела к бычьему и свиному инсулинам, тем самым сводя на нет их действие.

2. Модификация свиного инсулина синтетико-ферментативным методом. Свиной инсулин отличается от инсулина человека одной заменой на С-конце В-цепи Ala30Thr. В 1980 г. датская компания «Ново индастри» разработала метод *превращения инсулина свиньи в инсулин человека* путем замещения 30-го остатка аланина в цепи В на остаток треонина. Замену аланина на треонин осуществляют путем катализируемого ферментом отщепления аланина и присоединение вместо него защищенного по карбоксильной группе остатка треонина, присутствующего в реакционной смеси в большом избытке. После отщепления защитной О-трет-бутильной группы получают инсулин человека.

Основной недостаток данного способа заключается в высокой стоимости данного препарата.

3. Генно-инженерный метод с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Работы по генно-инженерному получению инсулина начались в 1978 году, был получен штамм кишечной палочки, продуцирующий крысиный проинсулин (США). Затем были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках E. coli.

1-й способ: раздельное (разные штаммы-продуценты) получение обеих цепей с последующим фолдингом молекулы (образование дисульфидных мостиков) и разделением изоформ.

2-й способ: получение в виде предшественника (проинсулина) с последующим ферментативным расщеплением трипсином и карбоксипептидазой В до активной формы гормона.

Наиболее предпочтительным в настоящее время является получение инсулина в виде предшественника. При обоих подходах возможно как индивидуальное получение исходных компонентов (А- и В-цепи или проинсулин), так и в составе гибридных белков.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Рисунок 3 – Схема синтеза инсулина
(https: //computerra. ru/wp-content/uploads/2014/05/GMO**)**

Задание 1. Записать основные этапы получения инсулина и зарисовать схему.

Соматотропин (гормон роста или ГР)

Соматотропин секретируется передней долей гипофиза. Впервые он был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза. Его недостаток приводит к заболеванию – гипофизарной карликовости (1 случай на 5000 человек). Гормон обладает видовой специфичностью. Молекула ГР человека состоит из 191 аминокислотного остатка.

Значение соматотропина (гормона роста)

1. Анаболическое действие – стимулирует транспорт аминокислот в клетках и синтез белка.
2. Стимулирует рост скелета и костей.
3. Увеличивает количество и размер мышечных клеток.
4. Увеличивает массу тела.
5. Вызывает уменьшение жира.
6. Повышает концентрацию жирных кислот в плазме и содержание сахара в крови.

Использование гормона роста в селекции животных

1. Увеличение молочной продуктивности лактирующих коров на 10-30 %.
2. Повышение содержания белка в молоке и мясе.
3. Повышение живой массы животных и увеличение прироста у овец, крупного рогатого скота и свиней на 20-30 %.
4. Уменьшение содержание жира в мясе.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Способы получения соматотропина (гормона роста)

1. Из *гипофиза* забитых на мясокомбинате животных. Количество его недостаточно. Гормона хватает лишь для лечения 1/3 случаев гипофизарной карликовости и лишь в развитых странах. Основные производители – Швеция, Италия, Швейцария и США. Препарат из гипофизов боенского материала представляет собой смесь из нескольких форм. Это приводило к тому, что у 30 % больных, получивших препарат, против гормона вырабатывались антитела, инактивирующие его биологическую активность.

2. Синтез ГР *методами генетической инженерии* в специально сконструированных клетках бактерий. Будучи синтезированным в клетках *E. coli*, ГР содержит дополнительный остаток метионина на H_2N-конце молекулы. *Биосинтез* гормона роста из 191 аминокислотного остатка был *впервые* осуществлен в 1979 году Д. Гедделем с сотрудниками. Сначала клонировали двунитевую кДНК; далее путем расщепления получали последовательность, кодирующую аминокислотный порядок гормона, за исключением первых 23 аминокислот и синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от первой до двадцать третьей, со стартовым ATG-кодоном в начале. Затем два фрагмента объединяли и подстраивали к паре lac-промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры, что составляет 1000 000 молекул гормона на клетку.

Полученный гормон на конце полипептидной цепи содержал дополнительный остаток метионина и обладал значительной биологической активностью. С 1984 г. после многолетних клинических испытаний на токсичность компанией «Генетек» (Сан-Франциско) было начато *широкомасштабное производство* бактериального соматотропина. ГР в клетках *E. coli* и в *культуре клеток животных* был получен в 1984 году одновременно в институте Пастера (Париж) и в Институте молекулярной биологии (Москва).

3. Выделение и промышленный синтез полипептида, аналога *гипоталамического релизинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ)*. Введение этого фактора способно компенсировать недостаток соматотропина. Таким образом, наличие СТГ-РФ и самого гормона, полученных в генетически сконструированных бактериальных клетках, очень важно для успешного *лечения заболеваний*, таких, как *карликовость* (для увеличения живой массы и ускорения роста человека и животных), всех форм *диабета*, регенерации тканей после *ожогов* и др. Это происходит за счет того, что он, *не обладая* видовой специфичностью, способен стимулировать освобождение гормона роста у человека и животных.

Получение интерферона.

Интерферон – это фактор устойчивости к вирусной инфекции, он препятствует размножению вирусов в клетке.

Наиболее изучены три группы интерферонов:

1) **α** (альфа-интерфероны, **α**-И), образующиеся при воздействии вирусов на лейкоциты;

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

2) **β** (бета-интерфероны, **β**-И), появляющиеся при воздействии вирусов на фибробласты;

3) **γ** (гамма-интерфероны, **γ** -И), продуцируемые Т-лимфоцитами в ответ на воздействие бактериальными и вирусными антигенами или антисыворотками против поверхностных детерминант лимфоцитов.

Все интерфероны (кроме **α**-И) – гликопротеины; они представляют собой типичные глобулярные белки, причем на долю **а-**спиральных структур приходится от 40 до 75 %. В **α**-И обнаружены две дисульфидные связи. Интерфероны – низкомолекулярные белки из 146 -166 аминокислотных остатков; видоспецифичны. Интерфероны широко используются *для лечения* различных тяжелых заболеваний – острого вирусного гепатита, рассеянного склероза, остеосаркомы, миеломы, ряда опухолей гортани, легких и мозга.

Методы получения:

1. *Извлечение из крови человека и животных* (из 1 л крови можно выделить всего 1 мкг интерферона, т. е. одну дозу для инъекции).

2. *Производство лимфобластоидного интерферона* из лимфобластоидных клеток. С этой целью культура данных клеток индуцировалась вирусом Сендай, после чего интерферон выделяли с помощью хроматографических колонок, заполненных моноклональными антителами против получаемого интерферона, выращивание в ферментерах объемом 2000 л; полученные интерфероны очищали с помощью моноклональных антител.

Из всех видов интерферонов для мирового производства наиболее пригоден **β**-интерферон. Фибробласты, получаемые из тканей плода, можно поддерживать в культуре клеток, что дает возможность массового производства. Метод получения **β**-интерферона был разработан в Англии.

Вышеперечисленные методы получения интерферонов характеризуются низким выходом, высокой стоимостью и недостаточной чистотой препарата.

3. *Биосинтез интерферонов с помощью генетически сконструированных микроорганизмов.* Это наиболее перспективный метод. Сложность заключается в том, что в смеси мРНК, кодирующих различные белки, содержание кодирующих интерферон чрезвычайно мало – всего 0,1 %, ДНК, полученные обратным транскрибированием, были клонированы в *E. coli* . Метод состоит из следующих *элементов*:

1. Ген интерферона человека встраивают в векторную ДНК.

2. Присоединяют к нему бактериальные регуляторные элементы, программирующие его транскрипцию и трансляцию в бактериальной клетке.

Синтезированный генно-инженерным способом интерферон был выделен, очищен, и его физико-химические свойства оказались близкими свойствам интерферона, полученного из крови доноров. Удалось получить *бактерии*, способные *синтезировать* до 5 мг интерферона на 1 л бактериальной суспензии, содержащей примерно 10^{11} бактериальных клеток, что в 5000 раз превосходит то количество интерферона, которое можно извлечь из 1 литра крови доноров.

В настоящее время гены интерферонов клонированы в дрожжи и клетки высших эукариот, способных осуществлять гликолизирование. Замена бакте-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

рий клетками дрожжей позволила увеличить производство интерферона в 10 раз. В России в 1994 году был осуществлен полный синтез гена **α**-И размером примерно 600 н. п. (нуклеотидных пунктов) в Институте биоорганической химии под руководством Н. М. Колосова.

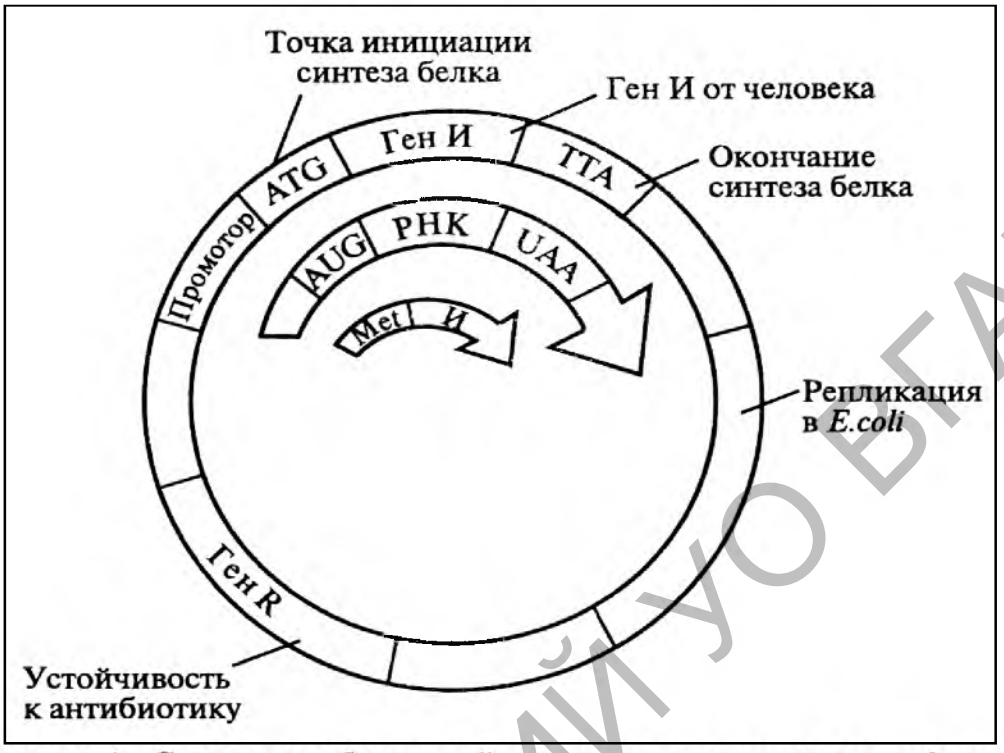


Рисунок 4 – Схема рекомбинантной плазмиды при синтезе интерферона человека в E. coli (По Ю.А. Горбунову)

Задание 2. Изучить способы получения соматотропина.

Задание 3. Зарисовать схему рекомбинантной плазмиды при синтезе интерферона.

Тема 4. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ. БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

1 час. Методы получения и перспективы использования трансгенных животных

***Цель занятия*:** освоить методику трансгеноза - переноса генов и получения трансгенных животных.

Контрольные вопросы:

1. Дать определение понятиям: «трансгеноз», «трансгенное животное».
2. Способы получения трансгенных животных.
3. Перспективы использования трансгенных животных.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Теоретическая часть

Трансгеноз – это перенос генов.

Трансгенные животные – это животные, которые получены в результате переноса в их геном чужеродных генов от других видов животных или человека. Гены, которые используются для переноса, выделяют из определенного генома или синтезируют искусственно.

Основные направления исследований для получения трансгенных животных:

1. Создание новых пород с повышенным содержанием некоторых компонентов.

2. Создание животных, которые способны синтезировать несвойственные их виду белки. (*Например,* свиньи, которые могут продуцировать интерферон человека).

3. Создание трансгенных животных-доноров при трансплантации органов человеку.

Методы переноса генов:

1) метод микроинъекции в пронуклеус зиготы;

2) метод использования липосом и ретровирусов в качестве векторов;

3) метод прокалывания и высокоскоростной механической инфекции;

4) метод использования сперматозоидов (самопроизвольное поглощение экзогенной ДНК, введение ДНК в сперматозоиды, введение в семенные канальцы взрослых животных);

5) метод использования трансформированных эмбриональных стволовых клеток.

Стадии получения трансгенных животных:

1. Создание генной конструкции (выбор, получение и клонирование чужеродного гена).

2. Введение клонированного гена в ядро оплодотворенной яйцеклетки путем микроинъекции гена в мужской пронуклеус.

3. Имплантация оплодотворенных яйцеклеток с экзогенной ДНК в реципиентную женскую особь.

4. Отбор потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.

5. Селекция модифицированных организмов. Скрещивание животных, несущих клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получение новой генетической линии.

Трансгенные животные:

- мыши с генами гормона роста крысы, ген был введен в виде раствора и состоял из 353 нуклеотидов, вектором была рекомбинантная плазмида. В результате был получен 21 потомок, у 7 мышей был обнаружен чужеродный ген, живая масса их была в 1,8 раза больше, чем обычных;

- трансгенные овцы с генами крупного рогатого скота, которые продуцируют с молоком *химозин* крупного рогатого скота. Это фермент, который применяется при производстве твердого сыра. Обычно его получали из экстракта ткани желудка новорожденных телят;

- кролики, коровы и свиньи с геном гормона роста человека;

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

- трансгенные животные, продуцирующие с молоком лекарственные вещества (факторы свертываемости крови против гемофилии; тканевой активатор плазминогена, применяемый при лечении венозных тромбов и поражении легочной артерии; человеческий белок С для предотвращения образования тромбов; моноклональные антитела для лечения рака).

Задание 1. Составить схему получения трансгенных животных с помощью ретровируса (рисунок 5).

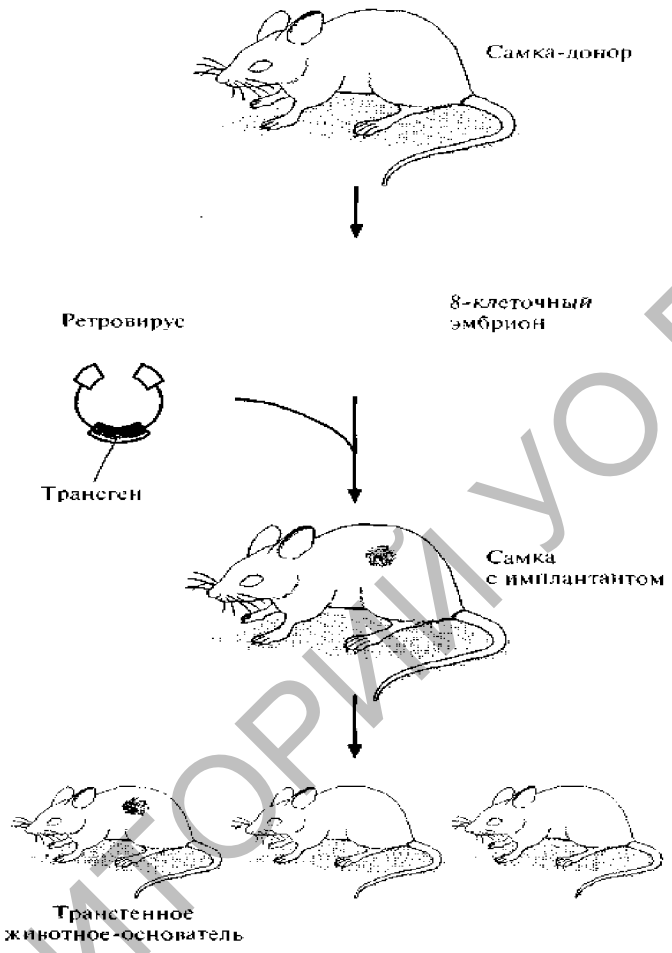


Рисунок 5 – Получение трансгенных животных с помощью ретровируса (По Б. Глику, Дж. Пастернаку)

2 час. Государственное регулирование генно-инженерной деятельности

***Цель занятия*:** изучить основные аспекты государственного регулирования генно-инженерной деятельности.

Контрольные вопросы:

1. Неблагоприятные последствия генно-инженерной деятельности.
2. Государственное регулирование и биобезопасность в системе международных отношений.
3. Государственное регулирование генно-инженерной деятельности в Республике Беларусь.
4. Особенности оценки безопасности генетически модифицированных продуктов для здоровья человека.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Теоретическая часть

Потенциальные неблагоприятные последствия генно-инженерной деятельности:

1. Неблагоприятные эффекты генно-инженерных организмов (ГИО) для здоровья человека:

- изменение активности отдельных генов живых организмов под влиянием вставки чужеродной ДНК, в результате которого может произойти ухудшение потребительских свойств продуктов питания, получаемых из этих организмов;
- горизонтальная передача трансгенов другим организмам;
- синтез новых белков-продуктов трансгенов, которые могут быть токсичными и/или аллергенными.

2. Неблагоприятные последствия высвобождения ГИО в окружающую среду:

- разрушительное воздействие на биологические сообщества и утрата ценных биологических ресурсов в результате засорения местных видов генами, перенесенными от ГИО;
- создание новых паразитов и усиление вредоносности уже существующих;
- выработка веществ-продуктов трансгенов, которые могут быть токсичными для организмов, живущих или питающихся не ГИО (например, пчел, других полезных или охраняемых видов);
- неблагоприятное воздействие на экосистемы токсичных веществ, производных неполного разрушения опасных химикатов.

Основные направления государственного регулирования биобезопасности в системе международных отношений:

- работы по созданию, испытанию и использованию генно-инженерных организмов в закрытых (изолированных) системах;
- высвобождение ГИО в окружающую среду с целью испытания;
- экспорт и импорт ГИО;
- использование ГИО в хозяйственной деятельности.

Биобезопасность в системе международных отношений

Конвенция о биологическом разнообразии – международное соглашение, принятое в Рио-де-Жанейро 5 июня 1992 года.

Целями Конвенции являются сохранение биологического разнообразия, устойчивое использование его компонентов и совместное получение на справедливой и равной основе выгод, связанных с использованием генетических ресурсов, в том числе путем предоставления необходимого доступа к генетическим ресурсам и путем надлежащей передачи соответствующих технологий с учетом всех прав на такие ресурсы и технологии, а также путем должного финансирования.

Конвенция была открыта для подписания Сторонами 5 июня 1992 года и вступила в силу 29 декабря 1993 года, подписали 145 государств.

Картахенский протокол по биобезопасности принят в 2000 году странами-Сторонами Конвенции о биологическом разнообразии (в т. ч. и Беларусь), который вступил в силу 11 сентября 2003 года. Картахенским он называется потому, что его почти приняли в 1999 г. на конференции в колумбийском городе Картахена-де-Индиас.

Основная цель Картахенского протокола – содействие обеспечению надле-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

жащего уровня защиты в области безопасной передачи, обращения и использования живых измененных организмов, являющихся результатом современной биотехнологии, способных оказывать неблагоприятное воздействие на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом также рисков для здоровья человека и с уделением особого внимания трансграничному перемещению (Картахенский протокол, Статья 1).

Присоединение к Картахенскому протоколу какой-либо страны не только обеспечивает возможность урегулирования вопросов, связанных с экспортом и импортом ГИО, но и создает предпосылки для создания национальной системы биобезопасности, которая является важнейшим атрибутом эффективного и безопасного использования достижений современных биотехнологий, развития генетической инженерии как одного из наиболее перспективных научных направлений.

Орхусская конвенция – конвенция Европейской Экономической Комиссии ООН «О доступе к информации, участию общественности в принятии решений и доступе к правосудию по вопросам, касающимся окружающей среды». Конвенция была подписана 38 странами в г. Орхусе в Дании 25 июня 1998 года на 4-й Конференции министров окружающей среды европейских стран в рамках Процесса «Окружающая среда для Европы». ***Цель Конвенции*** – поддержка защиты прав человека на благоприятную окружающую среду для его здоровья и благосостояния, на доступ к информации, на участие общественности в процессе принятия решений и на доступ к правосудию по вопросам, касающимся окружающей среды.

Нагойский протокол – 29 октября 2010 года был принят Нагойский протокол регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения. Протокол был принят Конференцией Сторон Конвенции о биологическом разнообразии на ее десятом совещании 29 октября 2010 года в Нагое (Япония).

Государственное регулирование генно-инженерной деятельности в Республике Беларусь

В Республике Беларусь создан Национальный координационный центр биобезопасности (*Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 963 от 19 июня 1998 г*). Центр успешно функционирует в качестве структурного подразделения Института генетики и цитологии НАН Беларуси с 1 января 1999 г. ***6 мая 2002 года*** принят Закон Республики Беларусь «О присоединении Республики Беларусь к ***Картахенскому протоколу по биобезопасности*** к Конвенции о биологическом разнообразии». ***9 января 2006 год***а принят Закон РБ «***О безопасности генно-инженерной деятельности».***

Обязанности Национального координационного центра биобезопасности:

- осуществление сбора, анализа и систематизации информации о законодательстве, научных исследованиях, полевых испытаниях, ввозе/вывозе, коммерческом использовании генно-инженерных организмов (далее ГИО) и продуктов на их основе в Беларуси;
- создание, поддержание и пополнение национальной Базы данных по биобезопасности;

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

- предоставление информации по биобезопасности заинтересованным министерствам и другим органам государственного управления, средствам массовой информации;
- обмен информацией по биобезопасности с координационными центрами других стран, международными организациями;
- обеспечение проведения научной экспертизы безопасности ГИО, использование которых предполагается на территории Республики Беларусь;
- оказание консультативных услуг министерствам и другим республиканским органам государственного управления в разработке законодательных актов и руководств по биобезопасности;
- оказание консультативных услуг министерствам и другим республиканским органам государственного управления в подготовке предложений по заключению двусторонних и региональных соглашений, в разработке международных соглашений по биобезопасности;
- учет лабораторий генетической инженерии.

Этапы оценки риска возможных неблагоприятных последствий использования ГИО:

1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических практик, связанных с присутствием трансгенов, которые могут оказать неблагоприятное воздействие ГИО на здоровье человека и окружающую среду.
2. Оценка вероятности возникновения неблагоприятных последствий, исходя из интенсивности и характера воздействия ГИО на потенциальную принимающую среду.
3. Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место.
4. Оценка совокупного риска, вызываемого ГИО, на основе оценки вероятности возникновения и выявленных неблагоприятных последствий.
5. Вынесение рекомендации относительного того, являются ли риски приемлемыми или регулируемыми, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

Для оценки потенциальной токсичности/аллергенности продуктов трансгенов используют:

- изучение происхождения трансгена;
- анализ структуры трансгенов и их продуктов, оценка гомологии с известными токсинами, аллергенами (по базам данных);
- анализ регуляторных элементов и характера экспрессии трансгенов (время и тканеспецифичность, концентрация продуктов трансгенов);
- анализ физико-химических и каталитических особенностей продуктов трансгенов (молекулярная масса, термостабильность, оптимум pH и т.п.);
- определение времени переваривания продуктов трансгенов в пищеварительном соке желудка и тонкого кишечника;
- острый (до 15 дней, ежедневная доза - до 5000 мг/кг веса) и хронический (до одного года) эксперименты на лабораторных и/или сельскохозяйственных животных для оценки неблагоприятных эффектов продуктов трансгенов;
- иммунологические тесты для оценки аллергенности продуктов трансгенов.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 1. Переписать этапы оценки риска возможных неблагоприятных последствий использования ГИО.

Задание 2. Изучить основные аспекты государственного регулирования генно-инженерной деятельности в Республике Беларусь.

ТЕМА 5. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. КУЛЬТУРА КЛЕТОК. ПОЛУЧЕНИЕ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ IN VITRO. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

***Цель занятия*:** усвоить методы культивирования и гибридизации клеток, изучить свойства микроорганизмов, методы селекции промышленных штаммов микроорганизмов.

Контрольные вопросы:

1. История развития и области применения клеточной инженерии.
2. Понятие о культуре клеток. Подбор и селекция продуцентов.
3. Стволовые клетки и их использование.

Теоретическая часть

Клеточная инженерия – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Культуры клеток, приготовленные непосредственно из тканей организма, называются *первичными.* Клетки первичной культуры можно переносить на новые питательные среды и получить *вторичные*, которые можно длительное время перевивать. Клетки на питательных средах сохраняют свойства тех тканей, из которых были получены.

Клетки человека и животных выращивают на специальных средах в виде суспензии или монослоя на стекле. Культивирование проводят при температуре 37°С и pH 6,8-7,5. Клетки растений можно культивировать на жидких и твердых питательных средах.

В настоящее время в промышленности применяют *три вида штаммов*:

1. Природные штаммы.
2. Штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций.
3. Штаммы, полученные методами генной или клеточной инженерии.

Требования к микроорганизмам:

1. Расти на дешевых и доступных субстратах.
2. Обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокую продуктивность целевого продукта при экономичном потреблении питательного субстрата.
3. Проявлять направленную биосинтетическую активность при минимальном образовании побочных продуктов.
4. Быть генетически однородными.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

5. Быть устойчивым к посторонней микрофлоре.

6. Быть безвредными (не обладать патогенными свойствами) для людей и окружающей среды.

7. Целевой продукт биосинтеза должен иметь экономическую и народнохозяйственную ценность и легко выделяться из сброженного субстрата.

Практическое применение культуры клеток животных

1. Используются в научно-исследовательской работе.
2. Для получения вирусных препаратов.
3. Для создания материала клеток при трансплантации.
4. Для синтеза физиологически активных веществ.
5. Для получения иммунорегулирующих, неспецифических активных веществ, медицинских препаратов.
6. Для изучения токсичности препаратов, применяемых в медицине, ветеринарии и биологических исследованиях.

Стволовые клетки (СК)

Стволовые клетки **–** популяция клеток-предшественников, обладающих высоким пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке в клетки обычно нескольких линий: в организме – в любые клетки данного органа, в эмбрионе – в любую клетку организма.

Они могут превращаться в один из 350 возможных типов клеток тканей. При этом они не входят в какую-либо тканевую структуру и сами непосредственно не выполняют каких-либо функций, а хранятся в состоянии покоя в специальных нишах до востребования.

Стволовые клетки – это незрелые клетки живых организмов, каждая из которых способна дифференцироваться. К ним относятся плюрипотентные (*омнипотентные*) и мультипотентные (*бластные*) стволовые клетки. Конечными элементами являются зрелые *юнипотентные* клетки тканей организма.

Созревание стволовых клеток проходит в несколько стадий. В результате, в организме имеется ряд популяций стволовых клеток различной степени зрелости. В нормальном состоянии, чем более зрелой является клетка, тем меньше вероятность того, что она сможет превратиться в клетку другого типа. Стволовые клетки можно выделять и выращивать в питательной среде, свойственной для данной ткани органа. Способность давать множество разнообразных клеточных типов (*плюрипотентность*) делает стволовые клетки важнейшим восстановительным резервом в организме, который используется для замещения удаленных в процессе операции пораженных участков органов искусственно выращенными.

Стволовые клетки могут использоваться для лечения и профилактики определенных заболеваний, применяться в генной и клеточной инженерии.

Обнаружить стволовые клетки можно по определению специфических белков, с помощью иммуногистохимического метода. На каждый белок получают антитела, которые метят флюоресцирующим красителем. Такой реагент выявляет белки, присутствующие в стволовых клетках на разных стадиях развития.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 1. Изучить таблицу 5.

Таблица 5 – Микроорганизмы и получаемые от них продукты

Продуцент	Продукт
Дрожжи	
Saccharomyces cerevisiae	Этанол, глицерин
Kluyveromyces flagilis	Этанол
Kl. iactis	Этанол
Schizosaccharomyces pombe	Этанол
Candida lipolityca	Лимонная, изолимонная, пировиноградная кислоты
Бактерии	
Clostridium acetobutylicum	Ацетон, бутанол
Cl. thermohydrosulfuricum	Этанол, уксусная, молочная кислоты
Cl. thermosaccharoliticum	Глюкоза, ксилоза, этанол, уксусная кислота
Cl. auranticum	Изопропандиол
Cl. thermoacticum	Уксусная кислота
Cl. propionicum	Пропионовая, акриловая кислоты
Xanthomonas campestris	Полисахариды
Zymomonas mobilis	Этанол, сорбит, глюконовая кислота
Thermoanaerobacter ethanolicus	Этанол, уксусная, молочная кислоты
Dunaliella sp.	Глицерин
Aerobacter aerogenes	2, 3 – бутандиол
Bacillus polymyxa	2, 3 – бутандиол
Lactobacillus delbrueckii	Молочная кислота
Acetobacter aceti	Уксусная кислота
Микромицеты (плесневые грибы)	
Aspelgillus niger	Лимонная, щавелевая кислоты
Penicillium chrysogenum	Пенициллин
As. oryzae	Ферментные препараты (амилаза)
As. awamori	Ферментные препараты (пектиназа)
Yarrovia lipolitica	Ферментные препараты (липаза)

Задание 2. Дать определение терминам, используемым при культивировании.

Таблица 6-Перечень основных терминов, которые используются при культивировании растительных и животных клеток	
Время генерации клетки	In vitro
Время удвоения популяции	Культура эксплантов
Дедифференциация	Линия
Дифференциация	Популяция клеток
Дифференцировка	Редифференциация
Инокулюм (трансплант)	Слияние изолированных протопластов
Каллус	Сомаклональные вариации и варианты
Клеточная селекция	Соматическая (парасексуальная) гибридизация
Клон	Субкультивирование
Культура каллусных тканей	Тотипотентность
Культивирование изолированных протопластов	Цикл выращивания Штамм
Культура клеток (суспензионная культура)	
Культура отдельных клеток	

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ТЕМА 6. ГИБРИДИЗАЦИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ

***Цель занятия*:** изучить методы получения гибридом и использование моноклональных антител.

Контрольные вопросы:

1. Сущность гибридизации соматических клеток эукариот.
2. Практическое применение соматической гибридизации.
3. Технология получения гибридом.
4. Использование моноклональных антител.

Теоретическая часть

Соматическая гибридизация – это направление клеточной инженерии, которое занимается слиянием лишенных оболочек соматических клеток и получением гибридных клеток с хромосомными наборами неродственных видов.

Практическое применение:

1. Построение карт хромосом.
2. Получение моноклональных антител на основе гибридомной технологии и их использование.

Гибридомы – это гибридные клетки между нормальным лимфоцитом и клеткой опухоли, способные производить моноклональные антитела. В 1984 году за открытие принципа получения моноклональных антител Сезар Мильштейн, Жорж Кёлер и Нильс К. Ерне получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

Этапы получения гибридом на основе иммунизированных лимфоцитов и миеломных клеток:

1. Получение миеломных клеток, погибающих при последующей селекции гибридомных клеток. Клетку миеломы выбирают так, чтобы она сама по себе не производила антитела и не имела гена гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ), что делает ее чувствительной к селектирующему агенту НАТ.
2. Получение лимфоцитов, которые продуцируют антитела к заданным антигенам. Для этого животное иммунизируют путем инъекции определенного антигена в течение 1-2 месяцев, потом выделяют клетки селезенки и от них отделяют лимфоциты.
3. Проводят слияние миеломных клеток с лимфоцитами при помощи нарушающего мембраны агента, такого, как полиэтиленгликоль или вирус Сендай. После слияния клетки в течение 10-14 дней поддерживают в среде, содержащей ГАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Аминоптерин блокирует синтез нуклеотидов, поэтому клетки материнской миеломы погибают.
4. Скрининг (селективный отбор) гибридных (гибридомных) клеток.
5. Проверка способности гибридомных клеток продуцировать моноклональные антитела к заданному антигену.
6. Клонирование гибридных клеток, которые проверены на образование моноклональных антител и контроль их иммунных свойств.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

7. Получение массовых культур гибридомных клеток. Размножение клонов гибридомных клеток происходит *in vitro* до необходимых объемов и служит источником получения антител. Большее количество можно получить путем введения клеточной суспензии в брюшную полость мышей, где гибридома размножается подобно раковым клеткам материнской миеломы, секретируя антитела во внутриполостную жидкость с образованием *асцита* (скопление жидкости в брюшной полости).

Задание 1. На основании схемы получения гибридом (рисунок 6) записать основные этапы их получения.

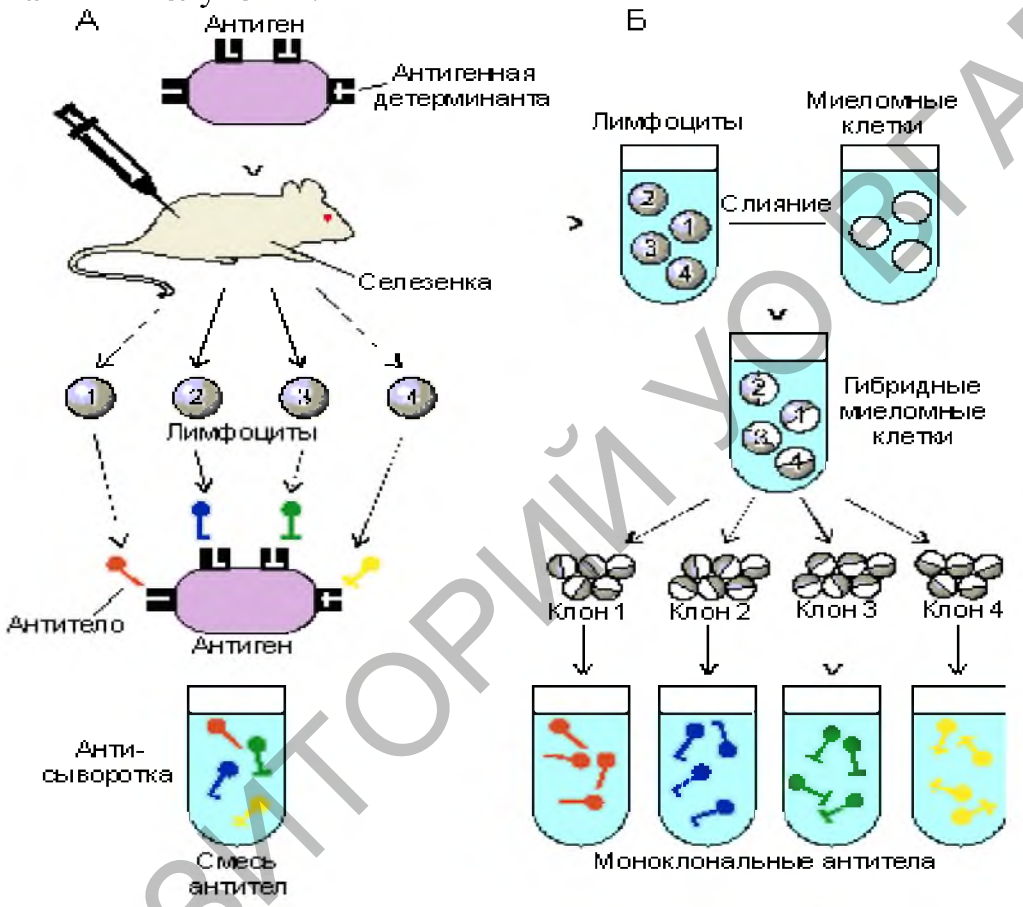


Рисунок 6 – Схема получения гибридом (https: //studfiles. net/html)

Задание 2. Переписать использование моноклональных антител.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКА)

- Совершенствование диагностики инфекционных, аутоиммунных, аллергических, врожденных и других заболеваний.
- Изучение эпидемиологии заболеваний.
- Усовершенствование вакцин.
- Раскрытие механизма дифференцировки тканей.
- Изучение патогенеза и иммунологии заболеваний.
- Расшифровка механизма иммунного ответа.
- Лечение инфекционных и онкологических заболеваний.
- Определение пола у крупного рогатого скота.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

С ПОМОЩЬЮ *МКА* МОЖНО ВЫЯВИТЬ:

• Полипептидные гормоны (гонадотропин, роста, лютеинизирующий, ФСГ, тиреотропный, пролактин).

• Маркеры опухоли (канцероэмбриональный антиген, специфический антиген предстательной железы, рецептор интерлейкина-2).

• Цитокины (интерлейкины 1-8, колониестимулирующий фактор).

• Лекарственные препараты (теофиллин, гентамицин, циклоспорин).

• Различные соединения (тиротоксин, витамин B_{12}, ферритин, продукты распада фибрина, TAU-белок).

Инфекционные заболевания (хламидиоз, герпес, краснуха, гепатит В, легионеллез, СПИД).

ТЕМА 7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНИРОВАННЫХ И ХИМЕРНЫХ ЖИВОТНЫХ

***Цель занятия*:** освоить методику клонирования, пересадки ядер, получения клонированных животных, изучить методы получения химерных животных разными способами.

Контрольные вопросы:

1. Дать определения понятиям «клон», «клонирование», «тотипотентность».
2. Клонирование эмбрионов. Диссекция эмбрионов.
3. Клонированные животные и перспективы их использования.
4. Дать определение понятиям «химера», «химерное животное».
5. Способы получения внутривидовых и межвидовых животных-химер, перспективы использования химерных животных.

Теоретическая часть

Клон – это группа генетически идентичных клеток или организмов, которые получены в результате деления одной клетки-предшественника.

Таблица 7 – История клонирования

Год	Ученые, страна	Событие, животное
1	2	3
1902	Ганс Шпеманн, Германия	разделение раннего эмбриона саламандры
1952	Роберт Бриггс и Томас Кинг, США	головастики
1962	Дж. Гердон, Англия	лягушки
1963	Тун Дичжоу (Tong Dizhou), Китай	азиатский карп
1981-1983	Дж. Мак Грат и Д. Солтер	мыши
1985	Слепцова Л. А., Дабагян Н. В., Газарян К. Г., СССР	костные рыбы
1986	Стин Вилладсен, Дания Нил Ферст (Neal First), Рэндал Прэзер (Randal Prather), Уиллард Айстоун (Willard Eyestone), США	корова
1988	С. Стик и Дж. Робл, США	кролик
1994	Нил Фёрст, США	генетические копии телят из эмбриональных клеток

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Продолжение таблицы 7

1	2	3
1984	Стин Вилладсен (Steen Willadsen), Дания	овца (метод пересадки ядра)
1995	Франция	крысы
1995	Иэн Уилмут (Ian Wilmut) и Кит Кэмпбелл (Keith Campbell) Шотландии	овцы Меган и Мораг
1997	лаборатория Дона Вольфа (Don Wolf) Орегонского регионального центра по изучению приматов	две макаки-резус
1997	группа ученых во главе с Яном Вильмутом, Шотландия	овца Долли
2000	группа ученых во главе с Яном Вильмутом, Шотландия	свинья
2001	компания Advanced Cell Technology, Inc.	бык-гаур по кличке Ноа (первое клонированное животное, относящееся к вымирающим видам)
2002	США	котенок
2003	Техас, США,	белохвостые олени
2003	Италия	лошадь – кобыла породы хафлингер
2004	компания Advanced Cell Technology, США	бантенг
2005	Южная Корея	афганская борзая Снуппи
2005	Китай	индийский буйвол
2006	США	хорек
2009	Дубай (ОАЭ)	верблюд
2011	США	койот
2018	США	макака-крабоед

Термин «генно-клеточная инженерия» появился на рубеже 1970-1975 годов. В это время *Бесквит Р.* впервые выделил ген. Благодаря этому, стало возможным после *удаления гаплоидного* ядра из яйцеклетки лягушки, *введение* в нее *диплоидного ядра* соматической клетки, взятой из кишечной стенки головастика. После электростимуляции деления яйцеклетки получают нормальное развитие зародыша и потомство исходной особи.

Работа по клонированию ведется по трем направлениям:

1. Пересадка ядер соматических клеток в энуклеированную яйцеклетку.
2. Получение гомозиготных диплоидных потомков.
3. Создание партеногенетических животных.

Методы получения клонированных животных:

1. Пересадка ядра соматической клетки в яйцеклетку, из которой удалено собственное ядро.

2. Разделение эмбрионов крупного рогатого скота в возрасте до 7-8 дней, не имеющих дифференцированных клеток, на части (2-4) с последующей пересадкой реципиенту.

В 1997 году в Великобритании методом пересадки ядра соматической

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

клетки в энуклеированную яйцеклетку Я. Вильмут получил овцу, которую назвали Долли. Клонирование было проведено путем ядерного переноса. Реципиентная яйцеклетка одной овцы была подвергнута удалению ядра. У другой овцы, находящейся на четвертом месяце беременности, из клеток кожи вымени было выделено ядро с хромосомной ДНК, которое пересадили в реципиентную яйцеклетку без генетического материала. Было взято беременное животное потому, что в этом случае клетки вымени активно делятся. После слияния некоторые клетки начали активно делиться, после доращивания *in vitro* эмбрион был имплантирован овце-реципиенту. В результате на свет появился ягненок, которого назвали Долли, она была похожа на овцу, у которой взяли ядро для пересадки.

Задание 1. Изучить таблицу 7.

Задание 2. На основании рисунка 7 написать основные этапы получения клонированных животных.

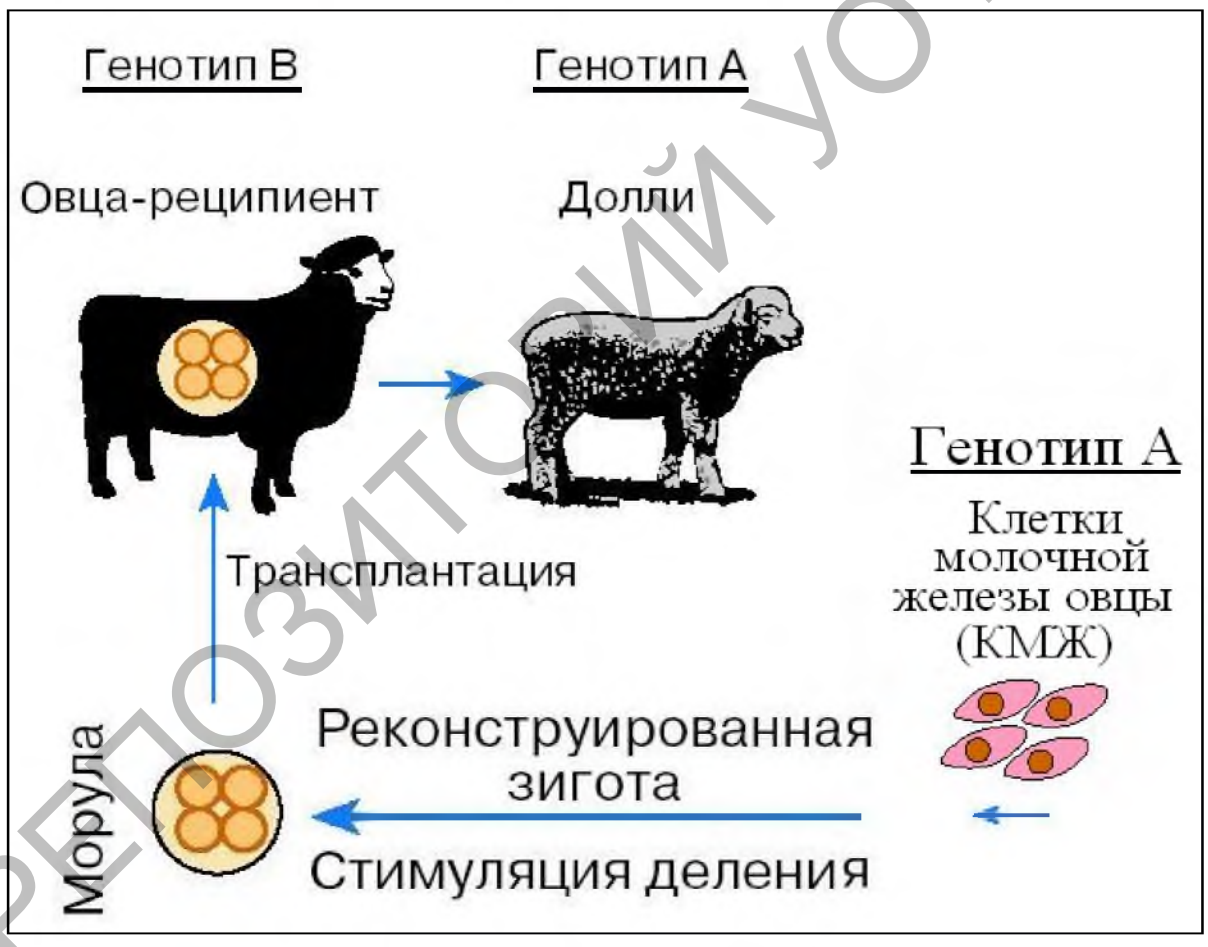


Рисунок 7 – Схема получения овцы Долли (по Я. Вильмуту)

Химерные животные

Понятие ***химера*** (греч. *Chimaira*) означает составное животное.

В животноводстве известны искусственные химеры как внутривидовые, так и межвидовые.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Способы получения химер

1. Инъекционный. Получение химерных животных путем объединения бластомеров из эмбрионов *одного вида.* С этой целью получают сложные химерные эмбрионы овец объединением 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов. Каждый сложный объединенный эмбрион состоит из равного числа бластомеров эмбрионов 2-8 родителей. Пересадку внутренней клеточной массы каждого донора (бластомеры) путем инъекции переносят внутрь бластоцисты реципиентов.

2. Агрегационный. Слияние клеточной массы двух или нескольких эмбрионов внутри одной зоны пеллюцида. Метод состоит в том, что 8-клеточные эмбрионы инкубируют в среде с протеолитическим ферментом, переваривающим оболочки яйцеклетки. Освобожденные от оболочек эмбрионы соприкасаются между собой, в результате чего их клетки сливаются и перемешиваются.

В Германии получены агрегационные химерные животные после соединения половинок 5-6-дневных эмбрионов от коров-доноров швицкой и голштинской пород крупного рогатого скота. Из семи полученных телят два сочетали в своем фенотипе характерную масть двух исходных пород – бурую и черно-пеструю. В США получены химеры овцы пород рамбулье и финский ландрас (Дж. Батлер и др. 1985). Из 15 полученных ягнят только у 5 методом анализа групп крови подтвердился химеризм.

Животные-химеры несут в себе признаки обоих эмбрионов, то есть являются потомками не двух, а четырех родителей. В 1993 году такой четырехродительский химерный теленок был получен в результате слияния эмбрионов двух подвидов крупного рогатого скота *Bos Taurus* и *Bos indicus*. Но при иммунологическом анализе у него был обнаружен эритроцитарный антиген, характерный для подвида *Bos Taurus*. Свои особенности наблюдаются и при получении межвидовых гибридов. Межвидовые химеры – эмбрионы после пересадки эмбрионов приживляются лишь в 10 % случаев. Примером получения межвидовых химер в животноводстве служат *овцекозы*, сочетающие признаки овцы и козы (К. Файл и др., 1994; С. Майнике-Тилмани, Б. Майнике, 1994). Ученые из Орегонского национального центра изучения приматов создали первых в мире химерных обезьян. Организмы этих трех животных, нормальных и здоровых, состоят из смеси клеток с шестью разными геномами.

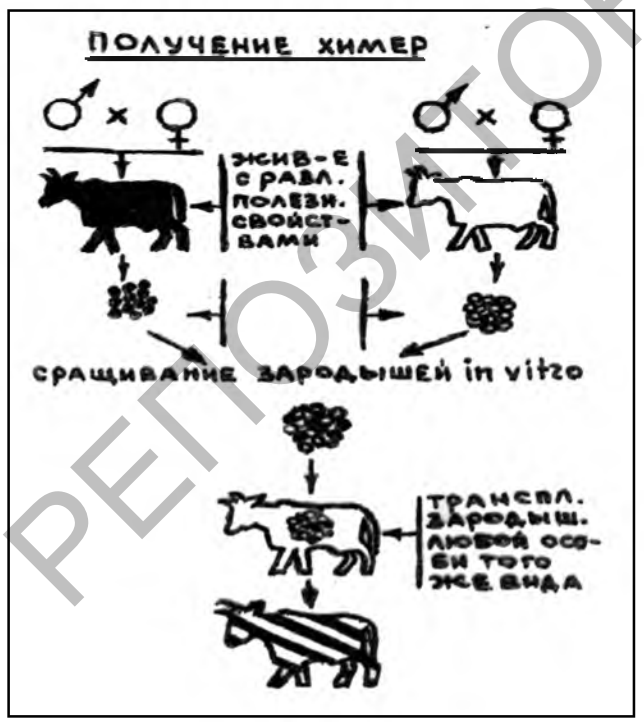


Рисунок 8 – Получение химер (генетических мозаиков) (по Ю.А. Горбунову)

Химерные животные не передают потомству характерную для них генетическую мозаичность, у потомков происходит расщепление, в результате чего нарушаются ценные генетические комбинации.

Задание 3. На основании рисунка 8 записать основные этапы получения химер.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ТЕМА 8. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

***Цель занятия*:** изучить основные способы получения антибиотиков.

Контрольные вопросы:

1. Классификация антибиотиков.
2. Продуценты антибиотиков.
3. Значение антибиотиков для животноводства и ветеринарии.
4. Биотехнологические методы производства антибиотиков.

Теоретическая часть

Антибиотики – это группа высокоэффективных биологически активных веществ, которые синтезируются микроорганизмами и способны убивать или подавлять рост живых клеток.

Использование антибиотиков в сельском хозяйстве

1. Антибиотики применяются для лечения животных и птиц.
2. Кормовые антибиотики используются для кормления животных и птиц.
3. Применяются антибиотики в растениеводстве для борьбы с болезнями растений, антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов и имеют ряд преимуществ перед химическими препаратами.
4. Антибиотики применяются также в пищевой промышленности для консервирования продуктов питания, для сохранения свежего мяса, молока, рыбы и т. д.

Классификация антибиотиков

1. По источнику получения

Природные	Полусинтетические	Синтетические
продуцируемые микроорганизмами – бактериями, грибками, актиномицетами, клетками высших и низших растений и млекопитающих (пенициллин)	получаемые при модификации природных структур в 2 этапа (природные + синтетические) (ампициллин, оксациллин)	созданы путем химических реакций (хинолоны – левофлоксацин, моксифлоксацин)

2. По типу действия

Бактерицидные – вызывают гибель инфекционного агента	Бактериостатические – прекращают или приостанавливают размножение возбудителя
пенициллин цефалоспорин аминогликозиды полимиксины	макролиды тетрациклины линкомицин хлорамфеникол

3. По спектру действия

Узкого спектра действия	Широкого спектра действия

Методы получения антибиотиков:

1. Химический синтез (с помощью этого метода получают основные синтетические антибиотики).

2. Биосинтез – прямая ферментация микроорганизма – продуцента (ис-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

пользуются штаммы микроорганизмов, синтезирующие наибольшее количество антибиотиков).

3. Мутационный биосинтез (мутасинтез) – применяются блокированные мутанты, у которых отсутствует или блокировано определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотиков. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик. Используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественников антибиотиков, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса мутагенеза.

Основные пути поиска новых антибиотиков:

1. Испытание новых продуцентов.
2. Химическая модификация антибиотиков.
3. Мутасинтез – испытание мутантных штаммов.
4. Клеточная инженерия – получение гибридных антибиотиков.
5. Генетическая инженерия – введение в геном микроорганизмов информации о ферменте, необходимом для синтеза антибиотика.

Задание 1. Изучить этапы технологии производства неочищенных антибиотиков.

Этапы технологии производства неочищенных антибиотиков

1. Посуду, инструменты, материалы стерилизуют, используя для этой цели автоклав. В него закладывают стеклянную посуду, затем герметически закрывают и проводят стерилизацию водяным паром в течение 30-45 минут. Наиболее эффективным способом стерилизации рабочего бокса является ультрафиолетовое облучение его бактерицидной лампой в течение 60 минут.

2. Для размножения гриба используют его исходную культуру, расфасованную в стеклянные флаконы. Для расплодки посевного материала производят посев грибка в колбу над пламенем спиртовой горелки. Колбы с посевным материалом ставят на специальную качалку для лучшей аэрации с целью более интенсивного роста грибка при температуре от 26 до 28°С на 18-24 часа.

3. Переносят посевной материал в большие бутыли и вновь помещают на качалку и подвергают встряхиванию при температуре 26-28°С в течение 18-24 часов.

4. Производят загрузку расплодки гриба и необходимых компонентов питательной среды в специальные реакторы для ферментации.

При изготовлении кормового нативного антибиотика ферментация протекает 24-36 часов. Через каждые 6-12 часов из ферментатора отбирают пробу для проверки антибиотика на активность. В процессе развития грибка в ферментаторе скапливаются газообразные продукты его жизнедеятельности, которые удаляются через шланг.

5. По окончании процесса ферментации антибиотиков культуральную жидкость *проверяют на активность* преимущественно следующими микробиологическими методами:

- *методом перпендикулярных штрихов на агаре*. Для этого вырезанную в питательной среде канавку заполняют средой с антибиотиком. Перпендикулярно канавке засевают различные виды микроорганизмов. Длина белых полосок указывает на неодинаковую чувствительность микробов к антибиотику.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

- *методом бумажных дисков*. Для этого на питательную среду, засеянную микробами, накладывают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиком. В центре наложен диск без антибиотиков (контрольный). Вокруг диска с антибиотиками роста микроорганизмов не наблюдается (зона угнетения);
- *методом цилиндриков*. Для этого в питательную среду, засеянную бактериями, погружают стеклянные или металлические незапаянные цилиндрики, которые заполняют антибиотиками. Ширина зоны угнетения округ цилиндриков указывает на антимикробные свойства антибиотиков.

Антибиотики выпускаются в жидком и сухом виде. После проверки на активность их расфасовывают в соответствующую посуду и этикетируют. Каждая серия антибиотиков обязательно снабжается наставлением о способе их использования.

Задание 2. Переписать нормы введения антибиотиков (таблица 8).

Таблица 8 – Нормы введения антибиотиков (г) на 1 т корма

Вид животных	*Бацитрацин*	*Гризин*	*Тетрациклин*
Телята: 1-12 месяцев	40	4	40
13-18 месяцев	20	2	20
Молодняк овец	30	3	30
Свиньи на откорме	20	2,5	20
Поросята-отъемыши (1-4 мес.)	20	2,5	20
Поросята-сосуны	50	5	40

ТЕМА 9. ПРОИЗВОДСТВО АМИНОКИСЛОТ. СИНТЕЗ БЕЛКА РАСТИТЕЛЬНЫМИ И ЖИВОТНЫМИ ОРГАНИЗМАМИ. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ, МИКРОБНОГО БЕЛКА, БЕЛКОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ИЗ РАСТЕНИЙ. ПРОИЗВОДСТВО КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ И КОРМОВЫХ ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

1-е занятие. Биотехнология получения аминокислот. Получение белка одноклеточных организмов, микробного белка и белковых концентратов из растений.

***Цель занятия*:** изучить способы получения аминокислот, белка одноклеточных организмов и белковых концентратов из растений.

Контрольные вопросы:

1. Аминокислоты, принципы получения.
2. Использование аминокислот в пищевой промышленности и животноводстве.
3. Биотехнология производства белка. Белок одноклеточных организмов.
4. Перспективы применения белковых продуктов в сельскохозяйственном производстве.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Теоретическая часть

Производство аминокислот

Составные части белка – аминокислоты – человек и высшие животные могут синтезировать лишь ограниченно, некоторые из них являются незаменимыми, т.е. они или не синтезируются в организме или синтезируются с недостаточной скоростью. К незаменимым аминокислотам относятся *валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин.* Часто к незаменимым относят *гистидин*, для молодняка также незаменимым является *аргинин.*

Способы получения аминокислот:

1. Гидролиз природного белоксодержащего сырья. При *гидролизе* белоксодержащее сырье (отходы пищевой и молочной промышленности) нагревают с растворами кислот или щелочей при 100-105°С в течение 20-48 часов. Чаще всего используют 20 % р-р HCl. Минусы – частичное разрушение некоторых аминокислот.

2. Химический синтез. Химический синтез - высокопродуктивные процессы, позволяющие с высоким выходом производить отдельные аминокислоты. Существенный минус – получение целевых продуктов в виде рацемической смеси D- и L-изомеров.

3. Микробиологический синтез. Микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельскохозяйственного и промышленного производства. Высокий выход и устойчивое содержание белков, могут быстро наращивать белковую массу.

4. Химико-микробиологический метод (биотрансформация предшественников аминокислот). Применяется *биотрансформация предшественников аминокислот*, предварительно полученных химическим путем, с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов или выделенных из них ферментов.

Аминокислоты в большом количестве используются в пищевой промышленности, являются вкусовыми добавками, дезодорантами пищевых продуктов, пищевыми красителями, консервирующими агентами и т. д.

1. *Глицин* – подсластитель, антиоксидант, бактериостатик.
2. *Аспарагиновая кислота* – усилитель вкуса, сырье для синтеза аспартама.
3. *Глутаминовая кислота* – усилитель вкуса, препарат для лечения психических заболеваний.
4. *Гистидин* – противовоспалительное средство.
5. *Метионин* – пищевая и кормовая добавки.
6. *Цистеин* – фармацевтический препарат.
7. *Треонин* и *триптофан* – пищевые и кормовые добавки.
8. *Фенилаланин* – сырье для получения аспартама.
9. *Лизин* – пищевая и кормовая добавки, сырье для получения искусственных волокон и пленок.

Аминокислоты применяются в животноводстве для сбалансирования кормов. При добавлении 2-4 дефицитных аминокислот к 1 т комбикорма общий расход кормов уменьшается на 10-20 %, а выход продукции увеличивается на 20 %. Аминокислоты используются в растениеводстве (могут ускорять или замедлять рост растений, используются в качестве средств защиты).

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 1. Зарисовать таблицу 9.

Таблица 9 – Содержание незаменимых аминокислот в различных белках (в г на 100 г белка)

Аминокислоты	Молоко коровы	Эталон ФАО	Соя	Горох	Рис	Пшеница	Кукуруза	Ячмень
Лизин	6,6	4,2	6,6	6,5	3,5	2,6	2,5	3,2
Триптофан	1,4	1,4	1,3	0,8	1,3	1,3	0,6	1,2
Метионин	2,4	2,2	1,4	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7
Треонин	4,6	2,8	3,8	3,8	3,5	2,6	3,2	2,9
Валин	6,9	4,2	5,4	4,5	6,5	4,6	4,4	5,4
Лейцин	9,9	4,8	7,9	6,5	8,0	6,9	11,2	7,2
Изолейцин	6,6	4,2	5,3	5,0	4,6	3,4	2,7	3,5
Фенилаланин	4,9	2,8	5,1	4,8	5,2	4,3	4,1	5,1

Задание 2. Изучить таблицу 10.

Таблица 10 – Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов (в граммах на 100 г белка)

Аминокислота	Микроорганизмы				
	дрожжи	водоросли	бактерии	грибы	актиномицеты
Валин	5-7	5-7	4-6	5-7	5,5
Лейцин	6-9	6-10	5-11	6-9	7,7
Изолейцин	4-6	4-7	5-7	3-6	5,3
Треонин	4-6	3-6	4-5	3-6	4
Метионин	1-3	1,5-2,5	2-3	2,5	1,3
Лизин	6-8	5-10	6-7	3-7	6,4
Фенилаланин	3-5	3-5	3-4	3-6	5
Триптофан	1-1,5	до 2	1,5	1,5-2	1,4

Производство белка

Для получения кормового белка используются дрожжи, бактерии, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, различные почвенные беспозвоночные – дождевые черви и др. Белок одноклеточных организмов (БОО) – это белок дрожжей, водорослей. Кормовые водоросли: хлорелла, сценедесмус, спирулина. Водоросли выращивают в открытых или закрытых культиваторах, товарный продукт приготавливают в виде порошка, суспензии или пасты.

Задание 3. Переписать название и механизм действия белковых препаратов, аминокислот и заменителей белка, применяемых в животноводстве.

Белковые препараты, применяемые в животноводстве

Глобулины неспецифические - представляют собой водный раствор глобулиновой фракции белка сыворотки крови животных. Прозрачный раствор. Содержит γ- и β-глобулины. Белковый препарат.

Действует стимулирующе, ускоряет рост и развитие животных.

Применяют для ускорения развития молодняка животных и предупреждения желудочно-кишечных заболеваний. Препарат назначают внутримышечно с первых дней жизни.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Дозы для ускорения роста и развития (на 1 кг живой массы): телятам – 0,7 мл, ягнятам и поросятам – 1 мл; с профилактической целью применяют: телятам – 0,5 мл, ягнятам – 0,7, поросятам – 2 мл.

Метионин - белый кристаллический порошок, растворимый в воде. Получают синтетически. Метионин – незаменимая аминокислота, постоянно присутствующая в организме.

Действие: участвует в обмене веществ, обезвреживании в организме ядов и продуктов обмена, синтезе многих гормонов и витаминов.

Применяют для ускорения роста и развития свиней.

Дозы внутрь: поросятам – 0,15 г на 1 кг живой массы.

Мочевина *(карбамид)* – белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Выпускают для кормовых целей в полиэтиленовых мешках, а для лечебных – во флаконах по 30 г, 60 и 90 г. К каждому флакону прилагается флакон с 10-процентным раствором глюкозы для получения 30-процентного раствора мочевины.

Является заменителем кормового протеина в рационе жвачных животных. В преджелудках жвачных животных бактерии рубца превращают белковый и небелковый азот рациона, в том числе азот мочевины, в аммиак, который затем используется для синтеза белка бактериальной клетки. В кишечнике бактерии перевариваются и белок усваивается организмом.

Действует мочегонно. В больших дозах мочевина токсична. Токсичность обуславливается образованием в рубце жвачных животных больших количеств аммиака. Избыток его не успевает утилизироваться в печени, поступает в кровяное русло и действует как сильный яд.

Применяют в качестве подкормки при недостатке протеина в рационе жвачных. Ежедневное применение бычкам по 60-70 г мочевины с рационом, богатым грубыми кормами, дает хорошие привесы при их выращивании. На рационе, богатом кукурузой, бычки могут усваивать до 100 г мочевины в сутки и давать хороший привес. Лактирующим коровам ее можно назначать до 1 % от всего рациона или до 3 – от массы концентратов.

Белки микроскопических грибов

Мицелий микроскопических грибов является ценным источником белка. Сырьем для промышленного выращивания микроскопических грибов служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлоза, лигнин. При этом одновременно решаются *две проблемы*:

1. Получение белковой массы.

2. Утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

В настоящее время используются атоксичные быстрорастущие штаммы мезо- и термофильных грибов для промышленного культивирования из родов *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Trichoderma.* По сравнению с дрожжами белки микроскопических грибов отличаются повышенным содержанием аминокислот и лучшей усвояемостью. Вместе с тем в биомассе грибов значительно меньше, чем в дрожжах, синтезируется белков (20-60 % от сухой массы) и у них относи-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

тельно медленнее происходит рост биомассы (удвоение биомассы через 8-16 часов, тогда как у дрожжей - через 2-3 часа).

Для ускорения роста грибов проводится предварительная обработка растительного сырья, повышающая доступность его компонентов для утилизации микроорганизмами (кислотно-щелочной способ обработки, отпаривание под давлением, обработка аммиаком и каустической содой).

После такой обработки происходит полное или частичное разложение трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина. Это обеспечивает ускоренный рост грибной массы и сокращает сроки промышленного культивирования грибов (до 7-8 суток).

Основные методы культивирования грибов:

I. Метод твердофазной ферментации, который включает:

1. Измельчение и обработку растительного сырья парами воды и аммиака.
2. Обогащение этого сырья минеральными веществами.
3. Посев и выращивание мицелия грибов в заданном режиме аэрации и поддержания определенной температуры.

Уровень содержания белка в выращиваемой грибной массе - 20-30 % от сухой массы.

II. Метод глубинного культивирования – выращивание грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности. Содержание белков в грибной массе до 50-60 % от сухой массы.

Также практикуется совместное культивирование грибов и бактерий. Наряду с использованием растительных отходов разработаны технологии по переработке в грибной белок торфа, навоза, экскрементов животных.

Грибная белковая масса используется в качестве *кормовой добавки* в значительно большей концентрации, чем кормовые дрожжи. Обычно *при кормлении молодняка* животных допускается введение в кормовые рационы грибного белка в пределах 15-20 % от белка корма, а при кормлении *взрослых животных* возможна замена в корме 50 % растительного белка на грибной.

Кормовые белковые концентраты из растений

Белки вегетативной массы трав и других растений имеют хорошо сбалансированный аминокислотный состав. Они различаются в основном по интенсивности синтеза белков, тогда как аминокислотный состав их белков довольно близок

По содержанию всех аминокислот белки трав значительно превышают эталон ФАО, и только лишь некоторый дефицит отмечается по количеству метионина. Наиболее высокую биологическую ценность белков имеют бобовые кормовые травы (80-90 %), несколько ниже биологическая ценность белков у мятликовых трав (75-85 %). Бобовые растения также отличаются более высоким содержанием белков в вегетативной массе (15-25 % от сухой массы), чем мятликовые травы (8-15 %). Особенно много белков содержится в листьях люцерны.

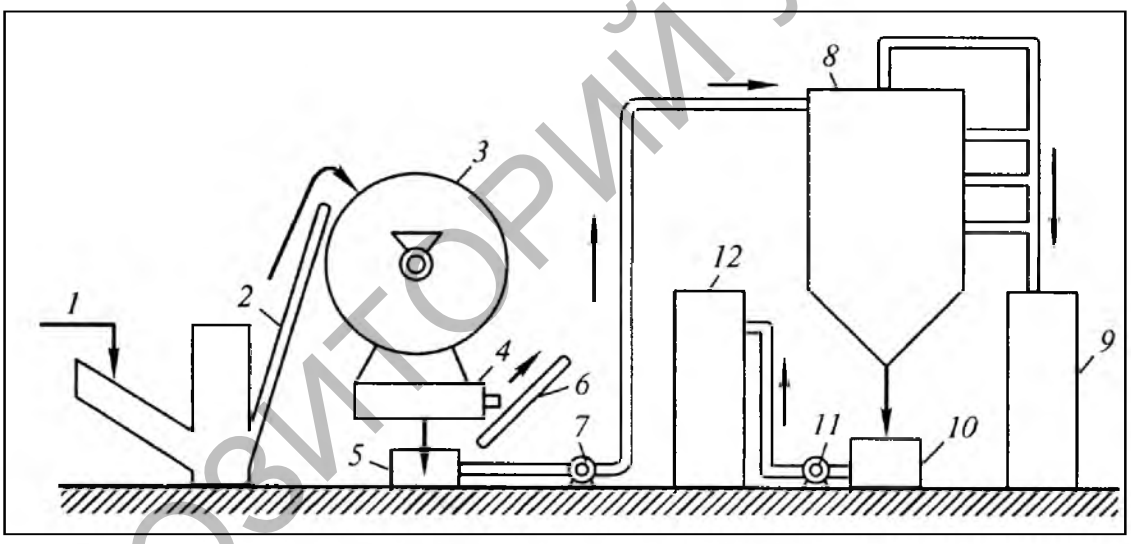
РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Таблица 11 - Содержание незаменимых аминокислот в белках вегетативной массы травянистых растений (г на 100 г белка)

Аминокислота	Белки травянистых растений	Эталон ФАО (эталонный" белок по шкале ФАО/ВОЗ)
Изолейцин	4,5-5,5	4,2
Лейцин	8,8-10,2	4,8
Лизин	5,6-7,3	4,2
Метионин	1,6-2,6	2,2
Фенилаланин	5,5-6,8	2,8
Треонин	4,7-5,3	2,8
Триптофан	1,2-2,3	1,2
Валин	5,9-6,9	4,2

Технология приготовления белковых концентратов из растительной массы путем отжатия сока:

1) измельчение растительной массы;
2) отжим сока;
3) коагуляция сока;
4) разделение коагулята на зеленую массу и коричневый сок;
5) консервирование белково-витаминной пасты.



1 – приемник зеленой массы; 2 – транспортер для подачи зеленой массы в измельчитель; 3 – измельчитель; 4 – пресс для получения растительного сока; 5 – сборник сока; 6 – транспортер для удаления жома; 7 – насос подачи сока в ферментер; 8 – ферментер-коагулятор; 9 – сборник ферментированного сока; 10 – сборник коагулята; 11 – насос подачи коагулята; 12 – сборник коагулята

Рисунок 9 – Технологическая схема получения кормовых белковых концентратов из вегетативной массы растений (по Ю. А. Горбунову)

В результате переработки растительной массы могут быть получены три вида кормов:

1. Белковый коагулят, содержащий 12-22 % белков на сухую массу, обычно *скармливают* жвачным животным в зимний период в виде белково-витаминной пасты до 50 % от белка кормового рациона.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

2. Ферментированный коричневый сок, образующийся после отделения белкового коагулята. Содержит 7-12 % сухого вещества, 1-3 % белков, 1-1,5 % органических кислот, 4-5 % безазотистых экстрактивных веществ (сумма легкоусвояемых углеводов), 1-2 % зольных веществ, 40-50 мг% каротина. Его добавляют в корм сельскохозяйственным животным (свиньям, например, 1,5 л на голову в сутки), также можно перерабатывать в кормовые дрожжи.

3. *Жом.* Используется для кормления животных, в его сухом веществе содержится 12-17 % белков, 3-4 % сырого жира, 8-9 % зольных веществ, 35 % сырой клетчатки.

Обычно для получения белково-витаминной пасты используют листья люцерны, клевера, сахарной свеклы. Белковую массу из листьев сахарной свеклы при соответствующей очистке можно также перерабатывать в пищевой белок.

Задание 4. Зарисовать «Технологическую схему получения кормовых белковых концентратов из вегетативной массы растений».

2-е занятие. Производство кормовых дрожжей и кормовых витаминных препаратов.

***Цель занятия*:** изучить основные способы получения кормовых дрожжей и витаминных препаратов.

Контрольные вопросы:

1. Значение кормовых дрожжей в кормлении животных.
2. Выращивание кормовых дрожжей.
3. Способы получения витаминов и перспективы применения кормовых витаминных препаратов в животноводстве.

Теоретическая часть

Дрожжи используются как источник белка для человека и животных. В России первый завод по производству кормовых дрожжей заработал в 1935 году. Дрожжи выращивали на гидролизатах из отходов древесины, которые при гидролизе образуют легкоусвояемые для микроорганизмов формы углеводов.

В качестве исходного субстрата для такого получения кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, корзинки подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, пивная дробина, торф, барда спиртовых производств, отходы молочной промышленности. Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida, Torulopsis, Saccharomyces.* При оптимальных условиях из 1 т отходов хвойной древесины можно получить 200 кг кормовых дрожжей.

Этапы технологии глубинного выращивания кормовых дрожжей в ферментерах:

1. Измельченное растительное сырье, содержащее большое количество клетчатки, подвергается кислотному гидролизу при повышенном давлении и

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

температуре, в результате чего 60-65 % содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов.

2. Полученный гидролизат отделяют от лигнина, избыток кислоты, применяемой для гидролиза, нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой.

3. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов.

4. Затем питательная среда подается в ферментерный цех, где дрожжи выращиваются в течение 20 часов. Режим постоянного перемешивания суспензии микробных клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации.

5. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с находящимися клетками дрожжей выводится из ферментера.

6. Выведенная из ферментера суспензия микробных клеток далее подается на флотационную установку, на которой производится отделение биомассы дрожжей от культуральной жидкости.

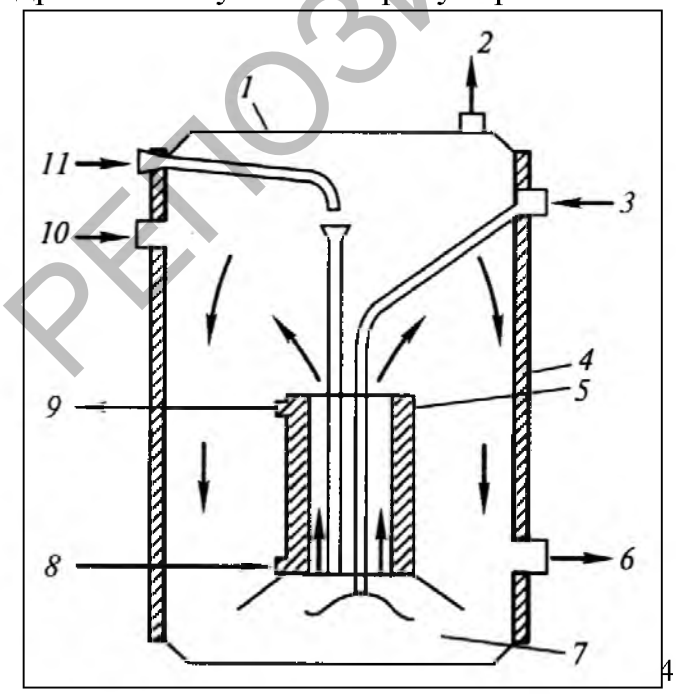
7. После отстаивания дрожжевая масса концентрируется при помощи сепаратора. Для достижения лучшей перевариваемости дрожжей в организме животных проводится специальная обработка микробных клеток (механическая, ультразвуковая, термическая, ферментативная), обеспечивающая разрушение их клеточных оболочек.

8. Затем дрожжевая масса упаривается до необходимой концентрации и высушивается, влажность готового продукта не должна превышать 8-10 %.

В сухой дрожжевой массе содержится 40-60 % сырого белка, 25-30 % усвояемых углеводов, 3-5 % сырого жира, 6-7 % клетчатки, витамины.

9. Посредством обработки дрожжей ультрафиолетовыми лучами проводится их обогащение витамином D_2, который образуется из содержащегося в них эргостерина.

10. Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые дрожжи выпускают в гранулированном виде.



1 – корпус ферментера;
2 – выход воздуха в атмосферу через очистительный фильтр;
3 – подача воздуха для аэрации и перемешивания питательной среды;
4 – охлаждающая рубашка;
5 – теплообменник;
6 – выход дрожжевой суспензии по окончании ферментации;
7 – кювета для направления потока воздуха во внутреннюю полость теплообменника;
8 – подача холодной воды в теплообменник;
9 – вывод теплой воды из теплообменника;
10 – подача посевной культуры;
11 – подача жидкой питательной среды

Рисунок 10 – Схема ферментера

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

для выращивания дрожжей
(по Ю. А. Горбунову и др.)

Кормовые дрожжи достаточно хорошо перевариваются в организме животных (переваримость белков - 80-90 %), по сумме незаменимых аминокислот близки к эталону ФАО, а по содержанию в белках лизина, треонина, валина и лейцина существенно превышают эталон ФАО, однако белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину и в них содержится мало других аминокислот.

На основе ферментации гидролизатов растительного сырья, наряду с производством кормовых дрожжей, получают также *этиловый спирт*. После отгонки спирта остается неиспользованный субстрат – барда, которая используется как питательная среда для выращивания кормовых дрожжей. Таким образом, из гидролизатов растительных отходов одновременно могут быть получены два вида ценной продукции.

Для выращивания кормовых дрожжей также используется *молочная сыворотка*, являющаяся производственным отходом при переработке молока. Дрожжеванию подвергается молочная сыворотка без предварительного выделения из нее белков, при этом выращиваются специальные виды кормовых дрожжей из рода *Torulopsis*. На основе *дрожжевания* молочной сыворотки производится три вида кормовых белковых продуктов:

1. Заменитель цельного молока для кормления молодняка сельскохозяйственных животных – «БИО ЗЦМ».

2. Жидкий белковый продукт «Промикс» с содержанием белков в 2,5-3 раза выше, чем в исходной молочной сыворотке.

3. Сухой, обогащенный дрожжевыми белками продукт «Провилакт», применяемый как заменитель сухого обезжиренного молока.

Производство кормовых витаминных препаратов

Витамины входят в состав каталитических центров ферментов. Микробиологическая промышленность выпускает два вида кормовых витаминных препаратов: 1 – кормовой рибофлавин, содержащий *витамин B_2*; 2 – *КМБ$_{12}$*, имеющий в своем составе витамин B_{12}.

Кормовые препараты витамина B_2 (рибофлавин). При недостатке витамина B_2 наблюдается ослабление окислительно-восстановительных процессов в организме. По нормам кормления этого витамина свиньям требуется не менее 2-7 мг, лошадям и птице – 2-5 мг на 1 кг сухого корма. Много рибофлавина могут синтезировать микроорганизмы – различные виды бактерий, актиномицеты, дрожжевые клетки. Некоторые из них способны накапливать в культуральной среде до 1 мг/мл витамина B_2.

В качестве промышленных *продуцентов кормового рибофлавина* используются отселекционированные штаммы дрожжей *Eremothecium ashbyii*. Рибофлавин накапливается в вакуолях дрожжевых клеток и придает культуре характерную желтую окраску. Для производственной ферментации готовятся отдельно жидкая питательная среда и посевной материал культуры дрожжей, выращенный в специальном посевном аппарате.

Питательная среда в необходимых концентрациях включает соевую муку,

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

кукурузный экстракт, мел, гидрол, сахар, K_2HPO_4, NaCl. Перед подачей в ферментёр она подвергается стерилизации. В качестве посевного материала используются споры *Eremothecium ashbyii*, выращенные на пшене.

Промышленное получение препаратов витамина B_2:

1. Промытое пшено в течение 30-35 минут выдерживается в молочной сыворотке для набухания, затем оно просушивается и расфасовывается по 50-60 г в простерилизованные флаконы. Во флаконах пшено подвергается трехкратной стерилизации, после чего производится его засев водной суспензией спор культуры дрожжей. Флаконы с засеянной культурой в течение 7-8 дней инкубируют при температуре 29-30°С, после чего высушивают в вакуум-сушильной установке и далее направляют для приготовления жидкого посевного материала, который после стерилизации подается в производственный ферментер.

2. Культивирование продуцентов кормового рибофлавина проводится при температуре 28-30°С в течение 72 часов. Через каждые 8 часов ферментации отбираются пробы для контроля за развитием микробных клеток, составом среды и накоплением целевого продукта. Готовая культуральная среда по окончании ферментации должна содержать до 5 % сухих веществ и 1,4 мг/мл рибофлавина.

3. В целях стабилизации витамина в процессе высушивания культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до pH 4,5-5,0, после чего она концентрируется в вакуум-выпарной установке. Полученный концентрат обычно содержит 5,6 мг/мл витамина и 20 % сухих веществ. После выпаривания избытка растворителя концентрат рибофлавина высушивается на распылительной сушилке до влажности 5-10 %, затем смешивается с отрубями или кукурузной мукой и расфасовывается по 20 кг в полиэтиленовые пакеты. В готовом продукте содержится не менее 1 % витамина. Срок хранения сухого препарата - 1 год.

Кормовые препараты витамина B_{12}. Этот витамин стимулирует образование крови в костном мозге, улучшает усвоение белков, участвует в синтезе аминокислот и азотистых оснований. Витамин B_{12} не содержится в продуктах растительного происхождения, и его единственным источником для сельскохозяйственных животных являются микроорганизмы.

Промышленное получение препаратов витамина B_{12}:

1. Выращивается специально подобранный биоценоз микроорганизмов, осуществляющих термофильное метановое брожение, в которое входят целлюлозоразлагающие, аммонифицирующие, углеводосбраживающие, сульфитвосстанавливающие и метанобразующие бактерии.

2. На первом этапе ферментации этих микроорганизмов в течение 10-12 дней наблюдается бурное развитие термофильных аммонифицирующих и углеводсбраживающих бактерий, которое происходит в слабокислой среде (pH 5,0-7,0). Другие группы бактерий данного биоценоза достигают интенсивного развития при переходе брожения в щелочную фазу (pH 7,0-8,5). Преобладающими в этот период являются метанобразующие бактерии, которые синтезируют в 4-5 раз больше витамина B_{12}, чем другие микроорганизмы биоценоза.

3. Для приготовления питательной среды используется барда, которая очищается от твердых примесей, в нее добавляется хлорид кобальта (4 г/м^3) и 0,5 метанола.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

4. В процессе культивирования бактерий:

- вначале производится выращивание посевного материала в течение 15-20 дней в аппаратах емкостью 250 $м^3$;

- затем посевной материал подается в ферментеры емкостью 2400 $м^3$, в которых происходит метановое брожение.

5. Свежая барда подается в нижнюю часть ферментера в количестве 25-30% от общего объема в сутки.

6. Отбор метановой бражки, содержащей витамин B_{12}, производится из верхней части ферментера.

7. В целях улучшения физических свойств сухой продукт смешивается с отрубями или кукурузной мукой, расфасовывается по 25-30 кг в полиэтиленовые пакеты и упаковывается в мешки.

Содержание витамина B_{12} в готовом кормовом препарате составляет 25-30 мг/кг, срок хранения – 1 год. Препарат имеет коммерческое название *КМБ-12* (*концентратно-микробный витамин*). Кроме витамина B_{12}, *КМБ-12* содержит также другие витамины группы В и незаменимые аминокислоты.

Задание 1. Переписать этапы технологии глубинного выращивания кормовых дрожжей.

Задание 2. Изучить технологию производства кормовых витаминных препаратов.

ТЕМА 10. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТЕРОИДНЫХ И ДРУГИХ ГОРМОНОВ В ЕСТЕСТВЕННОМ КОНТРОЛЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

1-е занятие. Биотехнологическая трансформация стероидных гормонов.

***Цель занятия*:** изучить основные способы получения стероидных гормонов.

Контрольные вопросы:

1. Классификация стероидных гормонов.
2. Исходное сырье для получения стероидов.
3. Значение стероидных гормонов для животноводства и ветеринарии.

Теоретическая часть

Стероидные гормоны синтезируются в коре надпочечников и половых железах из холестерина.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

<table>
<tr><td colspan="5">Стероидные гормоны</td></tr>
<tr><td colspan="3">Стероидные половые гормоны</td><td colspan="2">Гормоны коры надпочечников</td></tr>
<tr><td>эстрогены (синтезируются в основном в яичниках)</td><td>андрогены (синтезируются в семенниках у мужчин и корой надпочечников у женщин)</td><td rowspan="3">прогестерон</td><td colspan="2" rowspan="2">кортикостероиды</td></tr>
<tr><td rowspan="2">эстрадиол эстриол эстрол (фолликулин)</td><td rowspan="2">тестостерон андростерон и др.</td></tr>
<tr><td>минералокортикоиды (регулируют минеральный, водно-солевой обмен)</td><td>глюкокортикоиды (регулируют углеводный и белковый обмен)</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td>дезоксикортикостерон, альдостерон</td><td>кортизол, кортизон, кортикостерон</td></tr>
</table>

Исходное сырье для получения стероидных гормонов

Природные стерины – сырье для получения ценных лекарственных препаратов. Одним из наиболее важных и хорошо изученных стеринов является *холестерин*. Он обнаруживается почти во всех органах и тканях животных и человека. Холестерин принимает участие в физиологических процессах, происходящих в живой клетке, без его участия не может развиваться растущий организм. Стерины необходимы для осуществления физиологических и биохимических функций живого организма. Основные пути биосинтеза стероидных гормонов – из холестерина. В организме животных и человека из холестерина образуются три важные группы гормонов: прогестины, половые гормоны и гормоны коры надпочечников (кортикостероиды).

При образовании стероидных гормонов из холестерина сначала образуется *прегненолон* – основной промежуточный продукт биосинтеза стероидов и кортикостероидов. Окисление ОН-группы прегненолона в С=О сопровождается перемещением двойной связи; продуктом этой кетостероидизомеразной реакции является *прогестерон* – гормон плаценты и желтого тела.

Прегненолон является также предшественником мужских половых гормонов (тестостерона) и женских половых гормонов (эстрогенов – эстрона, эстрадиола). В коре надпочечников прогестерон превращается в *кортикостерон* и *кортизол* (гидрокортизон): секреция кортизола достигает у взрослого человека 15-30 мг в день. Эти вещества были первоначально выделены из коры надпочечников в кристаллическом виде.

Кортизол (гидрокортизон) и его синтетические аналоги такие, как преднизолон или дексаметазон, принадлежит к числу современных средств экстренной терапии, благодаря их уникальному противовоспалительному, десенсибилизирующему и противошоковому действию. По своему химическому строению они могут быть разделены на 11-дезоксистероиды, 11-гидроксистероиды, 11,17-дигидроксистероиды (к последним относятся кортизон и гидрокортизон).

Стерины растений (фитостерины) – служат источником получения многих ценных стероидных препаратов. Важнейший источник стероидных гормонов – культуры клеток растений. Так, культура клеток *диоскореи дельтовидной* корневого изготовления, продуцирует фитостерин *диосгенин* и его гликозидные

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

производные (сапонины).

Эргостерин является провитамином витамина D. Он встречается у растений, грибов, микроорганизмов и др. Особенно велико содержание эргостерина у дрожжевых микроорганизмов. Для промышленного получения эргостерина чаще всего используются пекарские дрожжи, содержание эргостерина в них колеблется от 0,2 до 15 % на сухую массу.

Стигмастерин – один из наиболее распространенных фитостеринов, он содержится в большом количестве в соевом масле и сахарном тростнике.

Ситостерины встречаются в хлопковом и соевом маслах, в зародышах пшеницы и натуральном каучуке, в сахарном тростнике и другом растительном материале. Ситостерины и стигмастерин – наиболее перспективные и дешевые исходные продукты для получения стероидных гормонов.

Биотрансформация стероидных гормонов

В основе синтеза стероидных гормонов лежат методы биотрансформации, результатом применения которых является превращение метаболитов в структурно родственные соединения под влиянием микроорганизмов или микробных клеток. Микроорганизмы в этом процессе могут влиять только на отдельные (единичные) стадии химического синтеза.

Микробиологическая трансформация – использование ферментативной активности жизнеспособных клеток микроорганизмов, в результате изменяется молекулярная структура трансформирующего субстрата.

1. Введение гидроксильной группы. Гидроксилирование осуществляется многими микроорганизмами, грибами (*Rh. nigricans*). Гидроксилирование – один из важнейших путей получения кортизона. Гидроксилированию подвергаются субстраты различного строения – от производных эстрана до сложных молекул стеринов, сапогенинов и т. д.

2. Дегидрогенизация стероидов. Дегидрогенизацию осуществляют бактерии и актиномицеты. Позволяет получать преднизолон из кортизона и гидрокортизона, дианабол из метилтестостерона. В качестве субстратов используются ацетаты стергоидов.

3. Микробиологическое восстановление. Осуществляется дрожжами и анаэробными бактериями, представителями микрофлоры кишечника.

4. Окисление гидроксильной группы в кетогруппу. Одна из наиболее частых реакций, осуществляемых микроорганизмами (бактериями, актиномицетами, грибами).

5. Гидролиз эфиров стероидов. Микробиологическое расщепление эфирной связи осуществляется представителями различных таксономических групп, в частности флавобактериями. Культура *Bac. megaterium* обладает специфической активностью по отношению к 21-ацетатам стероидов с диоксиацетоновой цепочкой.

6. Отщепление боковых цепей стероидов. Путь получения продуктов из дешевых природных стероидов животного и растительного происхождения – стеринов, желчных кислот, сапогенинов.

Задание 1. Изучить области применения стероидов при терапии (таблица 12).

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Таблица 12 – Области применения стероидов при терапии

Стероид	Заболевания
Глюкокортикоиды Кортизон Гидрокортизон Преднизон Преднизолон Дексаметазон	***Заболевания крови:*** гемолитическая анемия, острый лейкоз, угнетение костного мозга. ***Аллергии:*** астма, экзема, анафилаксия. ***Аутоиммунные заболевания:*** узелковый полиартериит, ревматоидный артрит, височный артериит. ***Прочие:*** язвенный колит, саркоидоз, нефротический синдром.
Половые стероидные гормоны Тестостерон Эстрадиол Прогестерон	***Гинекологические заболевания:*** эндометрит, метроррагии, кистозное перерождение яичников, гипофункция яичников, атония матки, ановуляторное состояние фолликулов в яичниках.

2-е занятие. Использование стероидных и других гормонов в естественном контроле репродуктивной функции.

***Цель занятия*:** изучить основные способы гормональной регуляции репродуктивной функции у животных.

***Контрольные вопросы*:**

1. Гормональная регуляция функции половых желез гормонами передней доли гипофиза.
2. Регуляция полового цикла у животных с помощью половых гормонов яичников.

Теоретическая часть

Методы контроля репродуктивной функции у животных

В организме животных и человека *передняя доля гипофиза* осуществляет регуляцию широкого спектра биологических процессов.

Передняя доля гипофиза у млекопитающих секретирует три гормона, которые оказывают стимулирующее и регуляторное действие на функцию половых желез. К ним относятся: *фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)*, *лютеинизирующий гормон (ЛГ)* и *пролактин (или лютеотропный гормон (ЛТГ)*. Секреция гонадотропных и половых гормонов происходит в разные фазы полового цикла.

В первые 6-8 дней после отела концентрация ЛГ в крови *коров* невелика. Затем этот показатель постепенно повышается. При этом увеличивается содержание ЛГ в гипофизе. Преимущественное возрастание концентрации ЛГ в гипофизе обусловлено биологической необходимостью создания запаса этого гормона для его предовуляторного выброса. Выделение из гипофиза другого гонадотропного гормона – ФСГ также увеличивается одновременно с развитием фолликулов.

С 7-10 дня после отела секреция ЛГ переходит в пульсирующую форму с интервалом 60-80 минут.

Уровень ЛГ в периферической крови *свиней* измеряют радиоиммунологическим методом. При этом обнаруживается подъем у всех животных в день охоты и в день, предшествовавший охоте. Наибольший подъем ФСГ наблюдался между 2 и 3 днями цикла, хотя подъем концентрации гормона в крови начинался одновременно с подъемом предовуляторного уровня ЛГ. Наряду с основным пиком

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ФСГ проявлялись дополнительные пики в другие периоды цикла, которые совпадали по времени с подъемом ЛГ.

У *овец* предовуляторный пик ЛГ проявляется в первые 12-16 часов после начала охоты и продолжается 8-10 часов. Величина его превышает базальный уровень в 30-50 раз. Овуляция наступает между 21 и 26 часами после пика ЛГ. Установлен небольшой подъем ЛГ на 14-15 день цикла.

Подъем концентрации ФСГ у овец установлен в день охоты (200 мг/мл). В другие дни цикла концентрация ФСГ в сыворотке крови составляет 100-160 мг/мл.

У *кобыл*, в отличие от других видов сельскохозяйственных животных, вместо короткого предовуляторного пика ЛГ концентрация этого гормона повышается постепенно в течение эструса и достигает пика через 1-2 дня после овуляции, а затем постепенно понижается в течение нескольких дней.

Концентрация ФСГ в сыворотке крови кобыл повышается в конце эструса и повторно в середине диэструса, за 10-13 дней до следующей овуляции. Эти пики ФСГ примерно в четыре раза превышают базальный уровень.

Важным звеном в понимании механизма регуляции полового цикла у животных является изучение *секреции половых гормонов яичников*. Выявлена одинаковая закономерность изменения уровня половых гормонов в крови основных видов сельскохозяйственных животных. В конце полового цикла происходит резкое падение уровня прогестерона. В отличие от жвачных, падение уровня прогестерона в крови *свиней* повышается в течение 5 дней, а у *овец* – 4 дней. Это, по-видимому, обусловлено большим числом желтых тел у свиней, чем у коров и овец.

Концентрация *прогестерона* в сыворотке крови кобыл обычно находится на низком уровне в период эструса, быстро повышается через 24-28 часов после овуляции, достигая пика через 5-7 дней. Этот уровень сохраняется в последующие 5-6 дней, а затем резко понижается между 14-16 днями. Затем наблюдается быстрый подъем концентрации эстрогенов, стимулирующий необходимое для овуляции выделение ЛГ у овец и коров. Уровни эстрогенов в крови коров и овец повышаются в три раза в течение полового цикла: в начале цикла до подъема уровня прогестерона, в середине цикла и перед регрессией желтого тела. Именно в этот период наблюдается заметное увеличение числа крупных фолликулов в яичниках коров.

Уровень *прогестерона* в крови у коров резко падает примерно за 24-28 часов до отела, а при наступлении отела снижается до минимума. В первые 2-3 недели после отела концентрация прогестерона в крови коров держится на низком уровне. При первом выбросе ЛГ происходит небольшое и кратковременное повышение секреции прогестерона. Именно это повышает чувствительность гипоталамо-гипофизарного комплекса, вследствие чего стимулируется секреция гонадотропных гормонов гипофиза, которая обеспечивает предовуляторный выброс ЛГ и первую овуляцию.

Гонадотропин-релизинг гормон (Гн-РГ), или *гонадолиберин*, контролирует гонадотропную функцию гипофиза. Он не видоспецифичен, применяется для регулирования сроков овуляции у животных. Его синтетический аналог *сурфа-*

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

гон имеет четко выраженную лютеолитическую функцию и способствует процессу полиовуляции фолликулов у коров – доноров эмбрионов. Сегодня препарат получают в достаточных количествах, что позволило перейти к изучению его роли в регуляции воспроизводительной функции у сельскохозяйственных животных.

Простагландин F2-альфа (ПГФ2-альфа) – лютеолитический фактор, у коров, свиней и овец ПГФ2-альфа выделяется из матки в виде выбросов волнообразно, каждый продолжительностью несколько часов и с интервалами времени. Регрессия желтого тела обычно наступает через 2 суток после начала выделения синтетического гормона ПГФ2-альфа, а охота – на третьи или четвертые.

Промышленностью синтезировано несколько аналогов препарата в форме *эстрофана* (Чехия), *просольвина* (Голландия), *магэстрофана* (Россия). Регрессия желтого тела после их инъецирования происходит через 24-48 часов, охота наступает через 76 часов.

Эстрогены усиливают кровообращение и секрецию слизи в половых органах. Повышенное содержания эстрадиола активизирует функцию гипоталамуса, который, в свою очередь, стимулирует выделение из передней доли гипофиза «овуляторного» количества лютеинизирующего гормона (ЛГ).

Под влиянием прогестерона эндометрий полностью подготавливается к приему и прикреплению зиготы и обеспечивает нормальное течение беременности.

ТЕМА 11. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ИХ ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

***Цель занятия*:** изучить основные виды ферментных препаратов, применяемых в животноводстве, способы их получения и иммобилизации.

Контрольные вопросы:

1. Использование ферментных препаратов в животноводстве.
2. Производство ферментных препаратов.
3. Методы иммобилизации ферментов и их практическое применение.

Теоретическая часть

Важным направлением современной биотехнологии является получение ферментных препаратов на основе культивирования микроорганизмов и использование их в сельском хозяйстве.

Ферменты – это биокатализаторы, функцией которых является проведение и регуляция химических реакций.

Источники получения ферментов. Ферменты выделяют из клеток всех видов живых организмов, но традиционным источником служат растения.

В настоящее время ферменты получают преимущественно из бактерий, так как они примерно в сто раз дешевле ферментов, выделенных из клеток расте-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ний и животных.

Высокопродуктивные штаммы микроорганизмов получают благодаря использованию *мутационного процесса* и методов генетической инженерии.

Поскольку растительные корма (зерно, силос, сенаж, грубые корма) содержат много трудноперевариимых веществ: клетчатки, лигнина, гемицеллюлозы, то положительный эффект кормовых ферментных препаратов при вводе их в комбикорма для животных и птицы заключается:

1) в разрушении стенок растительных клеток, благодаря чему повышается доступность содержащихся в них крахмала, протеина и жиров для воздействия ферментов пищеварительного тракта;

2) в повышении переваримости питательных веществ и улучшении их всасывания в тонком отделе кишечника;

3) в устранении негативного эффекта антипитательных некрахмалистых полисахаридов, особенно растворимой их части;

4) в компенсации дефицита собственных пищеварительных ферментов, особенно на ранних стадиях развития животных и птицы, а также при стрессах, когда выработка собственных ферментов резко снижается;

5) в улучшении микрофлоры в тонком отделе кишечника за счет снижения вязкости содержимого кишечника и повышения уровня моносахаридов.

Кормовые ферментные препараты способствуют улучшению производственных показателей в животноводстве и птицеводстве:

1) кормовая ценность рационов возрастает на 5-10 % за счет более полного извлечения питательных веществ и высвобождения энергии, повышения усвояемости крахмала, белка, лизина, метионина и липидов на 6-10 %;

2) снижается расход кормов на единицу произведенной продукции на 5-14 %;

3) возрастает продуктивность животных и птицы на 5-12 %;

4) появляется возможность замены основных дорогих компонентов кормов (кукуруза и соевый шрот) более дешевыми (пшеница, тритикале, ячмень, овес, рожь, подсолнечный шрот, жмых и другие дешевые источники белка и углеводов с повышенным содержанием клетчатки) без снижения продуктивности животных и птицы;

5) существенно снижается уровень кишечных заболеваний животных и птицы, а следовательно, потребность в лекарственных препаратах;

6) уменьшается количество и влажность помета, а также влажность подстилки;

7) улучшается экологическая обстановка окружающей среды за счет более полного усвоения азота и фосфора организмом животных и птицы и снижения таким образом выброса данных веществ в окружающую среду на 20-40 %.

Сухие кормовые ферментные препараты в отличие от жидких концентрированных форм можно вводить в сухие премиксы, белково-витаминно-минеральные добавки – в рассыпные комбикорма перед их гранулированием. В кормовые рационы, содержащие в кормовой части преимущественно овес и ячмень, целесообразно включать кормовые *ферментные препараты с высоким содержанием целлюлазы* и *β-глюканазы* и относительно меньшим *ксиланазы*. В кормовые рационы, содержащие в кормовой части преимущественно пшеницу,

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

рожь и тритикале, необходимо включать кормовые ферментные препараты с высоким содержанием *ксиланазы*, меньшим – *целлюлазы* и *β-глюканазы*.

Фермент *фитаза* активно катализирует гидролиз фитинового комплекса и существенно увеличивает усвоение органического фосфора комбикорма.

Ферменты кормового назначения получают преимущественно путем микробного синтеза с использованием грибов и бактерий**.**

Ферменты кормового назначения. Мультиэнзимные (МЭК) кормовые добавки ***«Кемзайм»*** («Кемзайм W сухой», «Кемзайм Плюс сухой», «Кемзайм сухой ячменный», «Кемзайм HF сухой», «Кемзайм W концентрированный сухой») устойчивы к широкому диапазону pH в пищеварительном тракте животных, к длительному хранению (до 1,5-2 лет), кратковременному высокотемпературному (до +80°С) воздействию при переработке кормов (в частности, при гранулировании), а также к видовым и возрастным особенностям свиней и птицы. 1 кг добавки «Кемзайм» повышает энергетическую ценность кормов в среднем на 490 МДж, что позволяет экономить до 40 кг зерновых. Содержит весь комплекс наиболее значимых для пищеварения ферментов (α-амилазы, β-глюканазы, протеазы, липазы и целлюлазы).

Фекорд 2004 *(Fekord-2004) новая отечественная мультиэнзимная композиция,* жидкая или сухая ферментная кормовая добавка. В настоящее время в Республике Беларусь на базе ООО «Фермент» производятся ферментные препараты для всех отраслей животноводства и всех видов и категорий сельскохозяйственных животных. Препараты Фекорд обладают широким спектром действия и рекомендуются к использованию в кормовых рационах птицы, свиней и крупного рогатого скота.

Для *крупного рогатого скота* улучшение переваримости сочных и грубых кормов наблюдается при добавлении в корм ферментных препаратов с активным комплексом гидролитических ферментов, таких как *пектофоетидин Г3х* и *целловиридин Г3х* в соотношении 1:1; *амилосубтилин Г3х* и *глюкаваморин Пх*. Для *телят* замена молока растительными кормами производится ферментными препаратами *пектофоетидин Г3х, амилосубтилин Г3х*, *протосубтилин Г3х, глюкаваморин Пх*, содержащими комплекс амилолитических и протеолитических ферментов.

При откорме *свиней* эффективное действие оказывают ферментные препараты с амилолитической и протеолитической активностью – *амилосубтилин Г3х*, *протосубтилин Г3х, амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, протезим Г3х. Поросятам-сосунам* рекомендуется добавлять в корм ферментный препарат *протезим Г3х*.

При кормлении *ягнят* в целях улучшения переваримости белков и углеводов в их кормовые рационы вводят *глюкаваморин Пх* и *амилоризин Пх***,** в результате чего приросты живой массы увеличиваются на 11-15 %.

Для птиц в кормовые рационы добавляют ферментные препараты с целлюлозолитической, пектолитической и протеолитической активностью – *пектофоетидин Г3х, целловиридин Г3х , амилосубтилин Г3х, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, протосубтилин Г3х, гликозидазу Г3х, лизоцим Г3х, протезим Г3х.* В результате применения указанных препаратов яйценоскость кур повышается на 5

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

%, приросты живой массы бройлеров увеличиваются на 7-15 %, тогда как расход корма на создание единицы продукции снижается на 4-7 %.

Применение ферментных препаратов также эффективно при кормлении *рыб*. При добавлении в кормовые рационы рыб *протосубтилина Г3х, амилосубтилина Г3х*, *пектаваморина Пх* в количестве 0,1-0,15 % значительно улучшается переваримость белков и других питательных веществ корма.

Ферментные препараты используются в *кормопроизводстве*, чаще всего при силосовании бобовых трав, картофеля и приготовлении соломоконцентратов.

Микробные ферментные препараты широко применяются *в ветеринарии* для лечения и диагностики многих заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц. Для этих целей применяются выпускаемые промышленностью ферментные препараты: *лизоцим Г3х, гликозидаза Г3х, лизосубтилин Г10 х, дрожжелитин Г3х. Амилосубтилин Г3х* и *протосубтилин Г3х* используют для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний, в частности алиментарных атоний преджелудков у жвачных животных, гельминтозов.

Высокоэффективные микробные препараты, широко использующиеся в животноводстве, производятся на основе *пропионовокислых* (пропиовит) и *ацидофильных* (пропиацид) бактерий, а также *азотобактерий* (азотацид).

Пропиовит представляет собой порошок серовато-песчаного цвета, содержащий в 1 г препарата 4-6 млрд. бактерий и 80-100 мкг витамина B_{12}, применяется для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта у телят, поросят, цыплят. При его применении нормализуется рост и развитие молодняка сельскохозяйственных животных, повышается их устойчивость к инфекционным заболеваниям.

Пропиацид и *азотацид* – сухие препараты комбинированного действия, способствуют образованию в желудочно-кишечном тракте животных уравновешенных биоценозов, особенно они эффективны против дисбактериозов.

Для борьбы с бактериальными и вирусными желудочно-кишечными заболеваниями применяются бактериальные препараты на основе *Bac. subtilis, licheniformis, mucilaginosis,* которые действуют как источники биологически активных веществ – ферментов, витаминов, антибиотиков, гормонов.

Задание 1. Переписать таблицу 13.

Таблица 13 – Важнейшие ферментные препараты, применяемые в животноводстве

Препарат	Область применения
1	2
Амилосубтилин Г3х	Добавление к кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика желудочных, паразитарных заболеваний
Протосубтилин Г3х	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных, птиц и рыбы; получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика желудочных и паразитарных заболеваний
Глюкаваморин Пх	Добавление в кормовые рационы телят и ягнят, свиней, крупного рогатого скота; при силосовании картофеля, бобовых трав
Пектаваморин Пх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

	птиц; при силосовании картофеля, бобовых трав

Продолжение таблицы13

1	2
Пектофоетидин Г3х	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; гидролиз БВК, дрожжей и растительных отходов; силосование бобовых трав
Амилоризин Пх	Добавление в кормовые рационы ягнят и при откорме свиней
Дрожжелитин Г3х	Получение ферментативных гидролизатов
Целловиридин Г3х	Добавление в кормовые рационы крупного рогатого скота и птиц; гидролиз растительных отходов; силосование бобовых трав
Гликозидаза Г3х	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получение ферментативных гидролизатов
Лизосубтилин Г10х	Получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика паразитарных заболеваний крупного рогатого скота
Протезим Г3х	Добавление в кормовые рационы свиней и птиц
Лизоцеллюлозин Г10х	Гидролиз дрожжей и растительных отходов; добавление в кормовые рационы птиц
Лизогризеин Г10х	Гидролиз дрожжей и растительных отходов
Мальтаваморин Г10х	Гидролиз растительных отходов
Целлолигнорин Пх	Гидролиз растительных отходов, силосование бобовых трав
Целлокандин Г3х	Гидролиз растительных отходов, силосование бобовых трав
Лизоцим Г3х	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; лечение и профилактика паразитарных заболеваний

Примечание. Буква Г означает, что препарат получен при глубинном выращивании микроорганизмов, П — получен из поверхностной культуры микроскопических грибов, 2 - показывает, что это конц. сироп, 3 - сухой ферментный препарат, 10 - очищенный фермент. препарат, Пх - высушенная поверхностная культура грибов.

Иммобилизация ферментов

Причины иммобилизации ферментов. Выделяемые из клеток свободные ферменты имеют ряд недостатков:

1) они растворимы в воде и во время выделения или при хранении могут потерять свою активность;

2) их порой трудно отделить от продуктов реакции.

Иммобилизация – полное или частичное ограничение свободы движения белковых молекул. *Сущность иммобилизации ферментов* – прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе, заключение в гель или в полунепроницаемую мембранную систему. Фиксированные таким образом ферменты обладают пролонгированным (более длительным) действием.

Преимущества иммобилизованных ферментов: 1) они стабильны и долго сохраняют свою активность; 2) легко отделяются от реакционной среды, что повышает качество получаемой продукции; 3) технологичны, возможно вести биотехнологический процесс непрерывно, регулировать скорость реакции и выход продукции.

Методы иммобилизации:

1) без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (*физические* методы иммобилизации);

2) с образованием ковалентной связи между ними (*химические* методы им-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

мобилизации).

Каждый из этих методов осуществляется разными способами.

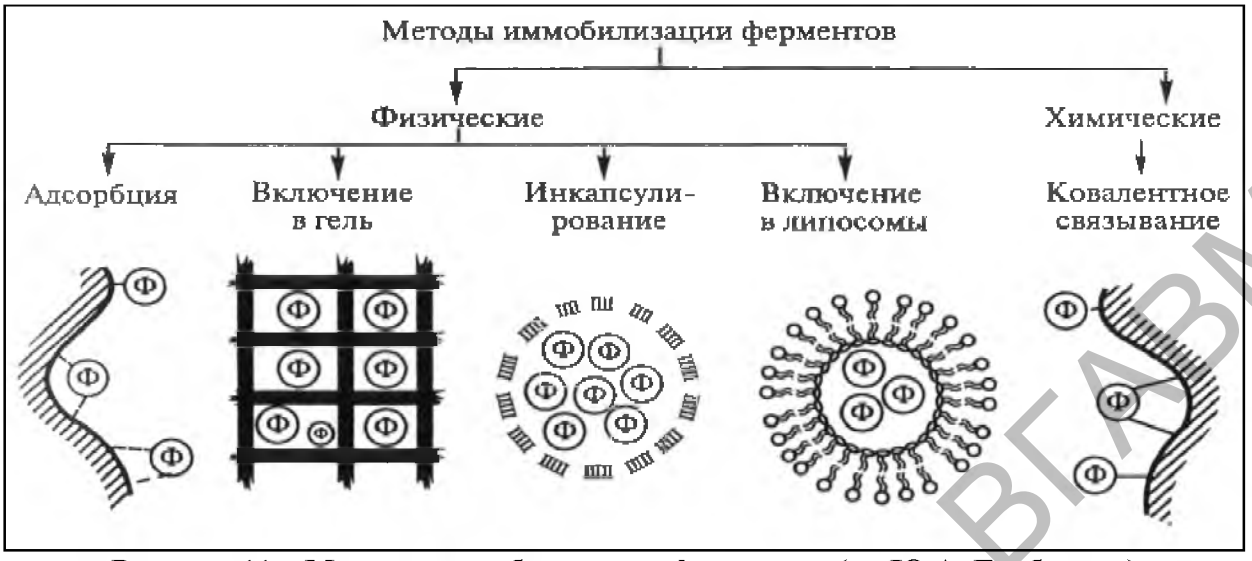


Рисунок 11 – Методы иммобилизации ферментов (по Ю.А. Горбунову)

Физические методы иммобилизации ферментов:

1) адсорбция ферментов на нерастворимых носителях;

2) включение энзимов в поры поперечно сшитого геля;

3) включение ферментов в полупроницаемые структуры (инкапсулирование и включение ферментов в липосомы).

Химические методы иммобилизации ферментов. Представляют иммобилизацию ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

Практическое применение иммобилизованных ферментов

1. *Пищевая промышленность*:

- производство хлеба;
- осветление фруктовых соков;
- получение глюкозы, которая используется в пищу человека и добавляется в корм животным;
- получение молочнокислых продуктов (кефира, йогуртов, сыра, творога и т.д.);
- получение глюкозофруктозных сиропов.

Фермент инвертаза расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу, его получают из пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis.*

Инвертный сахар кристаллизуется медленнее, чем сахароза, поэтому его применяют при изготовлении продуктов, в которых кристаллизация нежелательна – в полужидких начинках конфет, в ликерах, сиропах, в искусственном меде. Получаемая с помощью инвертазы *фруктоза* применяется в диетическом питании людей.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Лактаза – фермент, который расщепляет лактозу (сахар, содержащийся в молоке) на галактозу и глюкозу. Лактоза с трудом усваивается животными организмами, не сбраживается хлебопекарными дрожжами. Слабая растворимость лактозы мешает переработке молока. Применение иммобилизованной лактазы позволяет:

1) получать концентрированные молочные продукты;

2) избегать добавления химических стабилизаторов в мороженое;

3) увеличить питательность смесей для детского питания;

4) осуществлять ферментативный гидролиз лактозы в молочной сыворотке (позволяет применять ее в качестве корма для животных и птицы).

2. Химическая промышленность:

- производство стиральных порошков;
- дубление кож;
- производство тканей;
- превращение латекса в губчатую резину.

3. Медицина:

-для производства лекарственных препаратов;
- гемодиализ;
- лечение злокачественных опухолей;
- эффективное лечение ран, язв, ожогов, абсцессов и др.

Ферменты широко используют в медицине, например в составе лечебных препаратов**.** *Амилазу* и *липазу* применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени. В последние годы эффективно применяют *протеиназы* в лечении злокачественных новообразований, что объясняется бóльшей проницаемостью мембран раковых клеток для ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «*папайотин*»). Получение тромболитических ферментов. Фермент *плазмин* используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах; *коллагеназу* – для рассасывания рубцовых образований; *эластазу* – для задержки развития атеросклероза; *лизоцим* – для лечения конъюнктивитов; *дезоксирибонуклеазу* из стрептококка (*стрептодорназа*) – для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

Ферменты в медицине применяются для *диагностики.* Так, *аспартатаминотрансфераза* служит для выявления инфаркта миокарда; *аланинаминотрансфераза* – для диагностики заболеваний печени; *глутамилтрансфераза* – для блокировки отторжения органов при их пересадке и т. д.

4. Животноводство:

- производство кормов;
- получение кормовых добавок;
- повышение усвояемости кормов;
- для ускорения процесса силосования и улучшения питательных свойств силоса;
- для профилактики и лечения желудочных и паразитарных заболеваний у животных.

5. Растениеводство – для защиты растений от насекомых – вредителей.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 1. Изучить таблицу 14.

Таблица 14 – Основные продуктивные показатели по использованию фермента *Фекорд-2004* в кормлении кур - несушек

Показатели	Группы		
	1 (контрольная)	2 (опытная)	3 (опытная)
Среднегодовая яйценоскость на среднюю несушку, шт.	314 ± 2,4	332 ± 2,6	321± 2,1
Интенсивность яйценоскости, %	86	91	88
Затраты кормов: на 1 к / день, г на 10 яиц, кг	 116 1,35	 108 1,19	 112 1,27
Средняя масса яиц, г	59,9 ± 0,4	60,5 ± 0,3	60,2 ± 0,4

ТЕМА 12. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ, ПРЕБИОТИКОВ, ГЕРБИОТИКОВ И СИМБИОТИКОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

***Цель занятия*:** изучить основные виды микробиологических препаратов и способы их применения в животноводстве.

Контрольные вопросы:

1. Дать определение основным видам микробиологических препаратов (пробиотики, пребиотики, гербиотики, симбиотики).
2. Способы получения пробиотиков, пребиотиков и др.
3. Использование микробиологических препаратов в животноводстве.

Теоретическая часть

Использование микроорганизмов в сельском хозяйстве

В животноводстве используются пробиотики, пребиотики, гербиотики, симбиотики и другие микробиологические препараты для получения кормовых продуктов.

Пробиотики – это живые микробные культуры или споры полезных микроорганизмов, которые заселяют желудочно-кишечный тракт и улучшают микробный баланс. Используются в терапевтических целях, а также как пищевые продукты и биологически активные добавки, содержащие живые микрокультуры. Пробиотики делятся на две группы – жидкие и сухие, могут содержаться как в продуктах питания, так и в специально созданных и разработанных лекарственных препаратах или биологически активных добавках. Традиционными пробиотиками являются кефир, ряженка, сыры, йогурт, мацони, рикотта и другие молочнокислые изделия.

Пробиотики состоят из биологически однородных штаммов одного или нескольких видов микроорганизмов с хорошо известными свойствами. На сегодняшний день источниками пробиотических штаммов являются 9 родов микроорганизмов (таблица 15).

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Таблица 15 – Микроорганизмы, используемые для получения пробиотиков

Род микроорганизма	Название микроорганизмов
Лактобациллы	*Lb. acidophilus, Lb. plantarum, Lb. casei, L. paracasei, L. bulgaricus, Lb. fermentum, Lb. salivarius, Lb. lactis, Lb. reuteri, Lb. rhamnosus, Lb. fermentum, Lb. jonsonii, Lb. gasseri*
Бифидобактерии	*Bif. bifidum, Bif. infantis, Bif. longum, Bif. breve, Bif. adolescents, B. animalis*
Энтерококки	*E. faecium*
Стрептококки	*Str. salivarius, Str. thermophylus*
Непатогенные штаммы кишечной палочки	*E. coli M-17*
Спорообразующие бациллы	*B. subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. pumilus, B. circulans, штамм IP 5832 B. cereus*
Клостридии	*Cl. butyricum Miyairisan*
Дрожжевые грибы	*Saccharomyces boulardii, Saccharomyces cerevisiae*
Пропионовокислые бактерии	*Propionibacterium freudenreichii*

Принцип действия пробиотиков заключается в следующем:

• антагонистическая активность по отношению к *Escherichia coli, Staphilococcus aureus, Shigella sp., Salmonella typhimurium, enteritidis* и др.;

• продуцирование пищеварительных ферментов (амилаз, липаз, протеаз, пектиназ, эндоглюконаз);

• продуцирование рибофлавина и аминокислот, в т. ч. незаменимых;

• способность синтезировать биологически активные вещества, стимулирующие развитие целлюлолитических руминококков, лактобацилл;

• антитоксическое, в т. ч. подавление микотоксинов;

• иммуномодулирующее (активация макрофагов, стимулирование выработки интерферона, синтез иммуноглобулинов);

• восстанавливающее.

Пробиотические препараты *Лактицид, Стрептобифид-форте, Интестевит* помогают быстрой колонизации кишечника поросят здоровой микрофлорой.

Пробиотики для животных:

1- Субтилис (животные, птицы, рыбы).
2- Ветом (Vetom) (иммобилизованная высушенная споровая биомасса бактерий рекомбинантного штамма *Bacillus subtillis*).
3- Лактобифид.
4- Лактобифадол.
5- Спороветин.
6- Бифидумбактерин.
7- Лактоферон.
8- Биоферм (для жвачных животных).
9- Бифитрилак.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Пребиотики – это неперевариваемые кормовые ингредиенты, которые выборочно стимулируют рост и активность полезных бактерий в толстом кишечнике, что способствует улучшению состояния здоровья.

Основным компонентом пребиотиков являются пищевые волокна (полисахариды и лигнин), которые не перевариваются эндогенными секретами желудочно-кишечного тракта. Пищевые волокна способствуют улучшению пищеварения и формированию здоровой микрофлоры кишечника.

Свойства пребиотиков наиболее выражены во фруктозоолигосахаридах (ФОС), инулине, галакто-олигосахаридах (ГОС), лактулозе, лактитоле. Пребиотики содержатся в молочных продуктах, кукурузе, луке репчатом, цикории полевом, фасоли, горохе, крупах и др.

Наиболее важными и распространенными являются пребиотики:
- *лактулоза* и *лактоза* – обладают слабительным действием (молочные и кисломолочные продукты);
- *пищевые волокна* (клетчатка) (в том числе целлюлоза) – слабительное действие (нешлифованные крупы, цельнозерновой хлеб, плоды тыквенных растений, бобовые, овощи, фрукты и зелень);
- *инулин* – улучшает микрофлору кишечника, повышает иммунитет и способствует снижению холестерина (корни цикория, бананы, топинамбур);
- *пектин* – уменьшает всасывание глюкозы в кишечнике (снижает уровень сахара в крови) (печеные яблоки, бананы, груши).

Пребиотик ***рекицен*** усиливает адаптационные возможности организма животных, его устойчивость к стрессам, обладает общеукрепляющими свойствами и детоксикационными свойствами, а также способностью нормализовать микрофлору кишечника и общий обмен веществ в организме.

Пребиотик ***октафлор*** искусственно создан из натриевых и калиевых солей органических кислот, применяют для восстановления микрофлоры в желудочно-кишечном тракте и повышения усвояемости питательных веществ корма.

Задание 1. Изучить таблицу 16.

Таблица 16 - Отличие пробиотиков и пребиотиков

Свойства	Пребиотик	Пробиотик
Действие	Стимуляция роста естественной микрофлоры кишечника	Заселение кишечника микрофлорой извне
Состав	Вещества, которые являются пищей для полезных бактерий, находящихся в кишечнике	Живые клетки полезной микрофлоры кишечника: лактобациллы, бифидобактерии и т.д.
Проходимость через органы пищеварения	Не перевариваются и достигают кишечника в своем первозданном виде	Около 5-10 % достигают кишечника в своем первозданном виде
Эффективность	Стимулируют популяцию полезных для организма бактерий	Могут содержать 1-2 вида полезных бактерий

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 2. Изучить классификацию пребиотиков (таблица 17).

Таблица 17 – Классификация пребиотиков

Классификация пребиотиков	
Химическая природа	Пребиотики
Углеводы	Фруктоолигосахариды, ксилоолигосахариды, арабиногалактоолигосахариды, изомальтоолигосахариды, изомальтулоза, лактулоза, галактоолигосахариды, раффиноза, стахиноза, гентиоолигосахариды, циклодекстрины, палатиноза, ксилоглюкоолигосахариды, устойчивые крахмалы, пищевые волокна, лектинаны, гетероглюканы и др.
Белки	Гликопентиды, лактоглобулины
Витамины и их производные	Пантотеновая кислота, пантотенаты, инозит

Задание 3. Изучить способы получения пребиотиков (таблица 18).

Таблица 18 – Способы получения пребиотиков

Способы получения пребиотиков				
Способ получения	Выделение из природных источников	Ферментативный или кислотный гидролиз	Химический синтез	Ферментативный синтез
Источники	Соя, сахарный тростник, сахарная свекла, топинамбур, цикорий, молочная сыворотка, грибы и актиномицеты, злаковые (отруби)	Галактаны, ксиланы, хитин, ламинаран, арабиноксиланы, пектиновые вещества	Лактоза, сахароза, мальтиоолигосахара	Сахароза, мальтоза, лактоза, мальтодекстрины
Пребиотические вещества	Галакто-олигосахариды, фрукто-олигосахариды, инулин, лактоглобулины, гликопептиды, гетероглюканы, лентинаны, устойчивый крахмал, пищевые волокна	Галактоолигосахариды, арабиноксилоолигосахариды, галактуроноолигосахариды, N-глюкозаминовые олигосахариды, 1.3-глюкоолигосахариды	Лактулоза, трансгалактоолигосахариды, галактоолигосахариды	Фруктоолигосахариды, изомальтоолигосахариды, лактулоза, циклодекстрины

Гербиотики – это растительные экстракты, которые оказывают мембраностабилизирующее, противовоспалительное и анаболизирующее действие. Также они подавляют патогенную микрофлору и стимулируют иммунитет.

Гербиотики вводятся в стартовые комбикорма птицы. У цыплят повышается среднесуточный прирост живой массы на 7-13 % и жизнеспособность.

Оптимальные нормы ввода:

1. Поросятам молочного периода: 5 кг/т корма позволяют предотвратить диарею, снизить смертность и увеличить приросты живой массы.

2. Свиноматкам супоросным, подсосным и свиньям на откорме: 3 кг/т корма повышают общую продуктивность, резистентность организма, улучшают эффективность использования кормов, увеличивают скорость роста и количество здоровых поросят в расчете на одну свиноматку.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

3. Цыплятам, особенно для бройлеров первого периода выращивания (1-21 день): 3 кг/т корма увеличивают сохранность, приросты живой массы и стабилизируют функцию иммунной системы организма, повышают эффективность применения ветеринарных препаратов.

4. Курам-несушкам: 2 кг/т корма улучшают качество скорлупы яиц, особенно во второй период продуктивности.

Симбиотики – это смесь пробиотиков и пребиотиков, препараты, содержащие вещества способные избирательно стимулировать симбионтную микрофлору кишечника. Они представляют новое поколение уникальных кормовых добавок, совмещающих в себе про- и пребиотики с теми иммуностимулирующими субстанциями, которые существенно важны для молодняка. Комплексное действие пробиотика *Enterococcus faecium* и пребиотика *Inulin,* стимулирует развитие положительной *Bifidobacteria* в толстом кишечнике, закладывает основу для формирования здорового и защищенного кишечника – микрофлору.

Biomin IMBO содержит пробиотик, пребиотик и фикофитическую добавку. Добавляется в готовый корм в количествах, указанных в таблице 19.

Таблица 19 – Доза препарата *Biomin IMBO*

Вид животных	Профилактическая дозировка, кг/т	Дозировка при бактериальном заражении, кг/т
Птица	1,0	1,5
Поросята	1,5	2,0
Свиноматки	1,5	2,0

Биомин Имбо формирует и стабилизирует натуральную микрофлору кишечника и предупреждает колонизацию патогенов в нем по причине окислительных процессов, активизирует функцию микрофагов и лимфоцитов – повышает резистентность к инфекциям, защищает стенки кишечника от прилипания к ним патогенов, стимулирует рост бифидобактерий. Препарат способствует увеличению среднесуточного прироста живой массы на 16 %, снижает падеж на 2,72 %.

Задание 1. Изучить оптимальные нормы ввода гербиотиков свиньям и птице.

ТЕМА 13. УТИЛИЗАЦИЯ НАВОЗА И ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА. ТИПЫ И ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ БИОГАЗОВЫХ УСТАНОВОК

***Цель занятия*:** изучить основные аспекты проблемы защиты окружающей среды и способы переработки отходов животноводства.

Контрольные вопросы:

1. Биотехнологическая переработка навоза и отходов растениеводства.
2. Типы загрязнений поверхностных и подземных вод. Основные источники загрязнения водоемов и методы очистки сточных вод.
3. Переработка твердых отходов. Биодеградация ксенобиотиков.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

4. Биотехнологические методы утилизации целлюлозы, крахмала и жировых отходов.
5. Биотехнология получения биогаза из биомассы (навоза).

Теоретическая часть

Биотехнология переработки органических отходов направлена на решение таких важных задач, как:
- защита окружающей среды от токсических отходов животноводства;
- получение экологически чистого удобрения – зоогумуса;
- получение белково-липидного концентрата, который используется при разведении птицы, рыб, тутового шелкопряда, свиней, а также микроорганизмов.

Основные этапы биотехнологической переработки навоза:

1. Компостирование.
2. Получение биогаза из навоза.
3. Использование птичьего помета.
4. Извлечение полезных веществ (воды, кормов для животных, удобрений, витаминов и др.).
5. Получение органического удобрения – метанизированного навоза крупного рогатого скота в виде гранул.
6. Метод биологической переработки навоза с помощью личинок комнатной мухи – получение зоогумуса.

Типы загрязнения поверхностных и подземных вод:

1. Механическое – повышение содержания механических примесей.

2. Химическое – присутствие в воде органических и неорганических веществ токсического и нетоксического действия.

3. Биологическое – наличие в воде разнообразных патогенных микроорганизмов, грибов и мелких водорослей.

4. Радиоактивное.

5. Тепловое.

Основные источники загрязнения и засорения водоемов:

- недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов, отходы производства при разработке рудных ископаемых (воды шахт, рудников);
- сбросы водного и железнодорожного транспорта;
- пестициды и загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, качественно изменяют их состав.

Методы очистки сточных вод:

1. Механические методы. Отстаивание и фильтрация, удаление механических примесей. Грубодисперсные частицы улавливаются решетками, ситами, песколовками, навозоуловителями, нефтеловушками. Выделение из бытовых сточных вод до 60-75 % нерастворимых примесей, а из промышленных – до 95 %.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

2. Химические методы. Добавление в сточные воды различных химических реагентов, которые вступают в реакцию с загрязнителями и осаждают их в виде нерастворимых осадков. Уменьшение количества нерастворимых примесей до 95, а растворимых – до 25 %.

3. Физико-химические методы (электролиз, окисление, адсорбция, экстракция, ионообменная хроматография, ультразвук, высокое давление). Удаление тонкодисперсных и растворенных неорганических примесей, а также разрушение органических и плохо окисляемых веществ.

4. Биологические методы. Использование биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоемов. Для очистки сточных вод используют биофильтры, биологические пруды и аэротенки.

Отстой сточных вод

В зависимости от степени обработки отстой городских сточных вод обычно делят на:

- *первичный* (необработанный), состоящий из твердых веществ;
- *вторичный* – твердые вещества, выделяющиеся после вторичного отстоя, или отстой с биофильтров очистных сооружений;
- *третичный* – результат третичного отстоя сточных вод (известь и глина);
- *отстой, перегнивший в анаэробных условиях*.

Переработка твердых отходов

Захоронение – наиболее простой, но экологически бесперспективный способ. Органическое вещество в таких захоронениях разлагается достаточно медленно - до 30-50 лет.

В начальной стадии переработки твердых отходов преобладают аэробные процессы, в ходе которых наиболее легко разрушаемые молекулы используются беспозвоночными (клещами, червями, нематодами), низшими грибами и микроорганизмами.

На следующей стадии происходит разложение макромолекул лигноцеллюлозы, лигнина, танина и меланина, которые способны только к медленной деградации. Продолжительность этого периода сильно варьирует и частично зависит от предобработки. Высокая температура (до 80°С) и присутствие антибиотиков микробного происхождения приводят к гибели или инактивации патогенных микроорганизмов и вирусов, личинок насекомых и семян растений. Через некоторое время кислород поглощается аэробной микрофлорой, накапливается CO_2 и наступает стабильное метановое брожение, в выделяющемся газе содержится 50-55 % CH_4, около 40 % CO_2 и 5 % N_2. Газ, образующийся на свалках, можно получать в больших количествах и использовать.

Задание 1. Переписать этапы биотехнологической переработки навоза.

Получение биогаза

Постановлением Совета Министров РБ от 9 июня 2010 года № 885 была утверждена программа развития энергоисточников, работающих на биогазе, на 2010-2012 годы. Согласно документу, до конца 2012 года в стране планирова-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

лось построить 39 биогазовых установок общей мощностью 40,4 МВт в основном для предприятия.

Биогазовые комплексы позволяют вырабатывать электроэнергию из биогаза, получаемого при брожении органических отходов. Биогазовые установки производят электрическую и тепловую энергию, высококачественные удобрения, обеспечивают утилизацию отходов, сокращают выбросы метана в атмосферу.

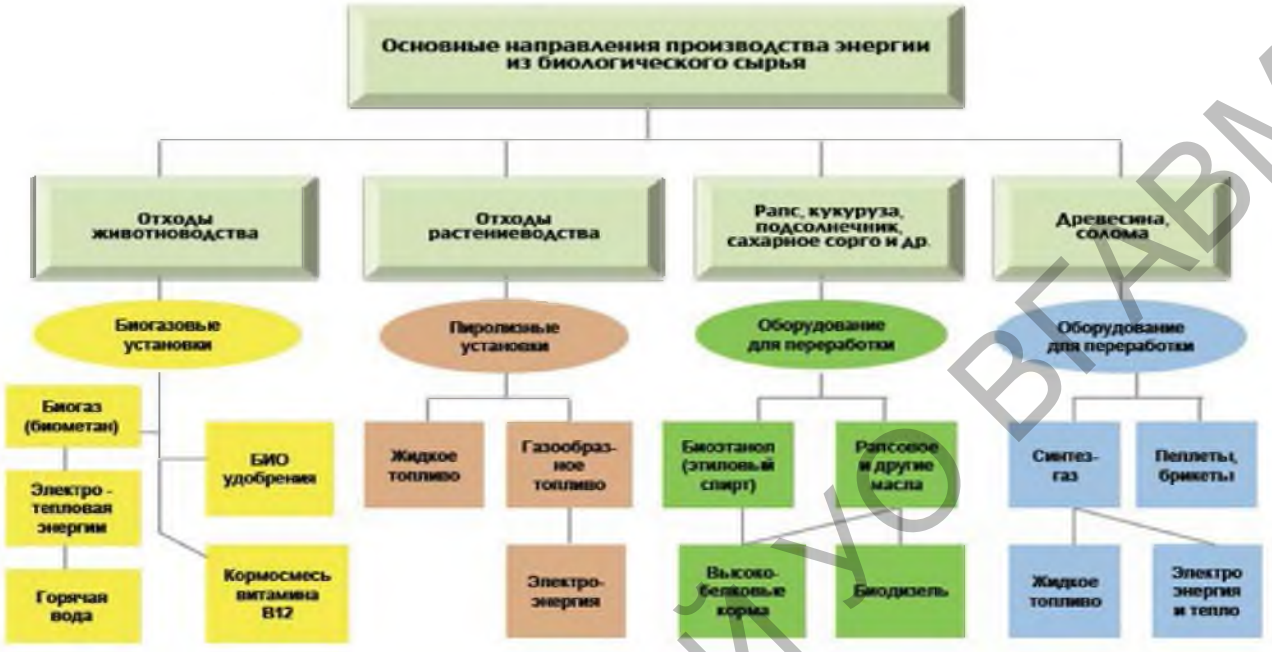


Рисунок 12 – Основные направления производства энергии из биотехнологического сырья (https://cf.ppt-online. org/files/slide)

Основные этапы получения биогаза из биомассы (навоза)

Биогаз – это смесь, содержащая 50-80 % метана и 20-50 % углекислого газа, также содержащая 1 % сероводорода и примеси азота, кислорода, водорода и угарного газа.

Производство биогаза осуществляется периодическим или непрерывным способом в железобетонных или металлических аппаратах для анаэробного культивирования, которые называются *биореакторы* или *метантенк*.

Биометаногенез – это процесс превращения биомассы в энергию. Это сложный микробиологический процесс, при котором органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в анаэробных условиях. В анаэробном процессе биометаногенеза участвуют свыше 190 различных микроорганизмов.

Стадии биометаногенеза:

1. *Ферментативный гидролиз*. Под действием экстрацеллюлярных ферментов гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения – белки, липиды, полисахариды. Около 76 % органических веществ переходит в высшие жирные кислоты, до 20 % – в ацетат и 4 % – в водород.

2. *Ацидогенез* (кислотообразование). На этой стадии участвуют две группы микроорганизмов: 1-ацетогенные (ферментируют моносахариды, спирты и органические кислоты с образованием H_2 и CO_2, низших жирных кислот, в основном ацетата, спиртов и некоторых других низкомолекулярных соединений)

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

и 2-гомоацетатные (усваивают H_2 и CO_2, образуют водород). Образуется 52 % ацетата и 24 % водорода.

3. *Метаногенез*. Метаногенные бактерии образуют из ацетата 72 % метана, из H_2 и CO_2 – 28 % метана.

Для получения биогаза используются отходы сельскохозяйственного производства, испорченные продукты, стоки крахмалоперерабатывающих предприятий, отходы сахарных и спиртовых заводов, бытовые отходы, сточные воды городов.

Таблица 20 – Биогазовые установки в Республике Беларусь

Хозяйство	Год ввода в эксплуатацию	Суточная выработка электроэнергии, кВт/ч
РУП «Племптицезавод «Белорусский» Минский район	2008	4200
РУСП СГЦ «Западный» Брестский район	2008	10500
ОАО «Гомельская птицефабрика»	2009	8025
СПК «Рассвет» Кировского района Могилевской области	2012	59127
СПК «Агрокомбинат «Снов» Несвижского района Минской области	2011	10110
СПК «Лань-Несвиж» Несвижского района Минской области	2012	-

Задание 2. Зарисовать схему биогазовой установки (рисунок 13).

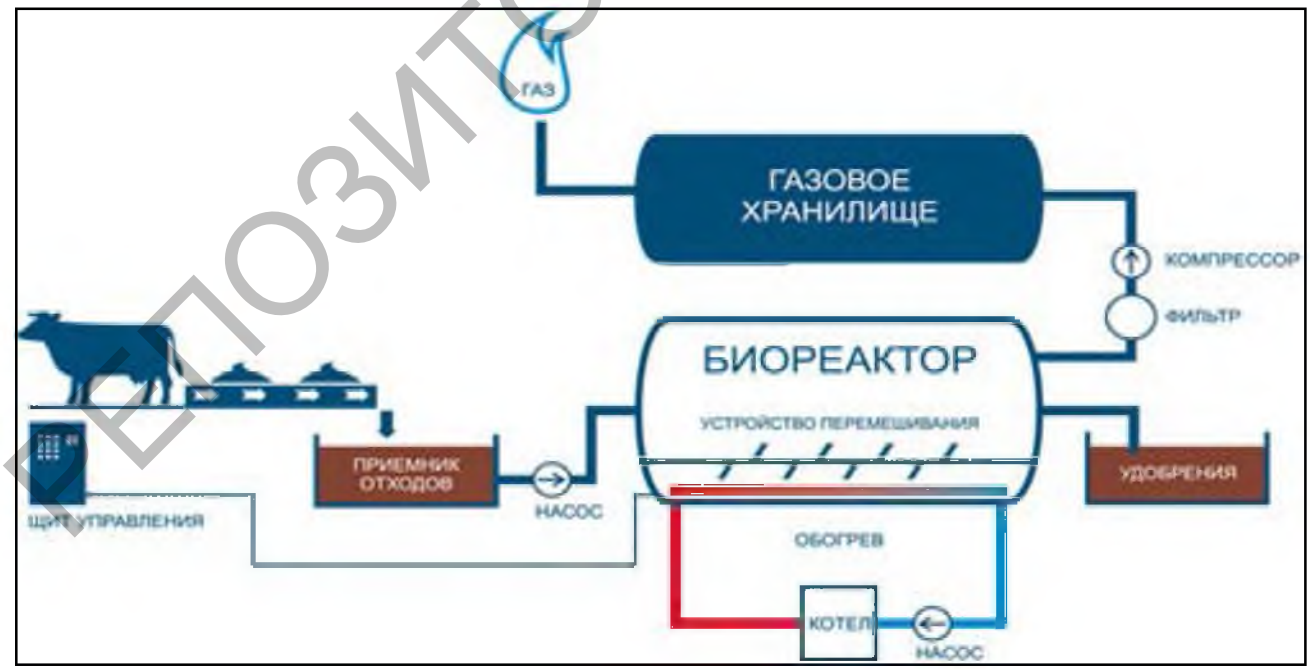


Рисунок 13 - Схема биогазовой установки
(https://sudremkomplekt.ru/assets/nico)

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Задание 3. Изучить классификацию биогазовых установок (рисунок 14).

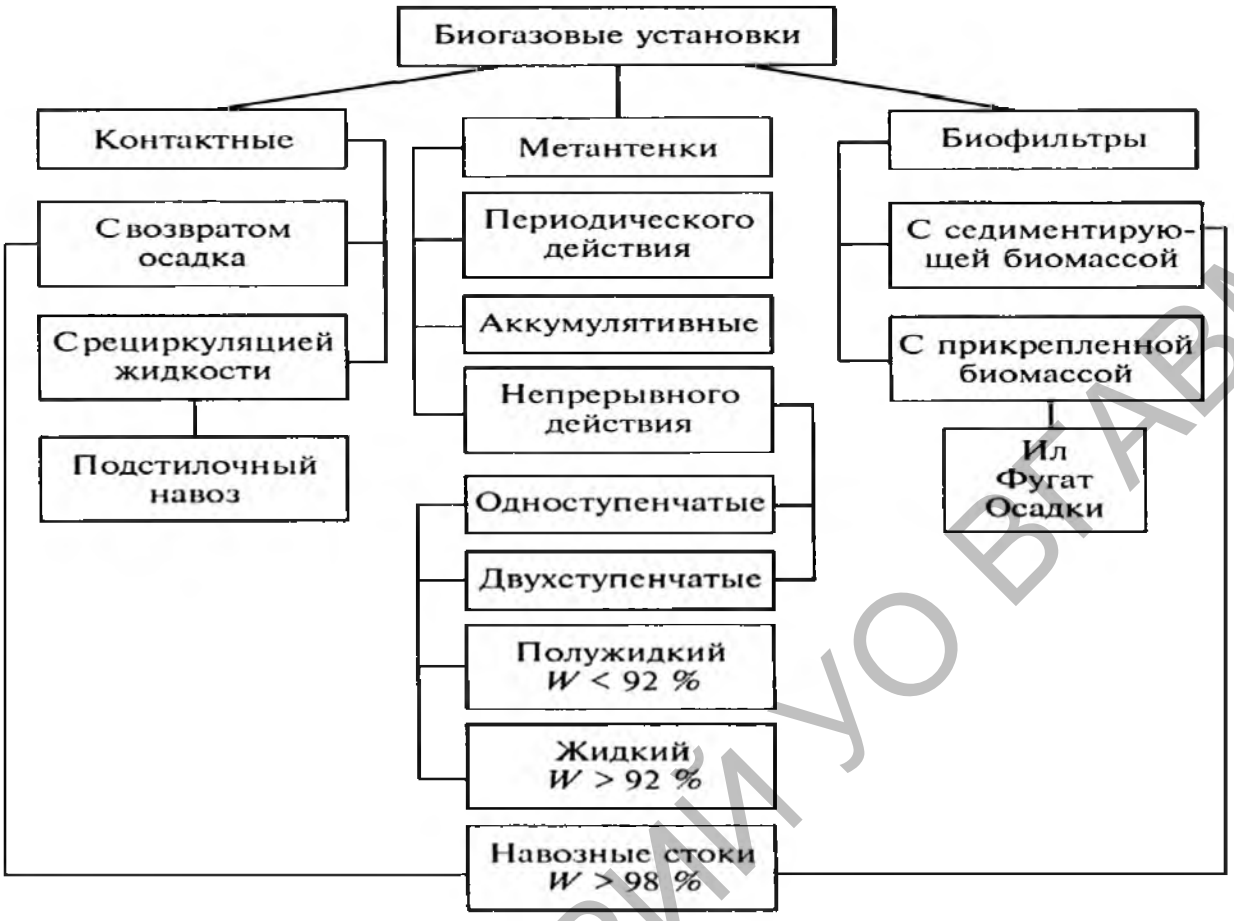


Рисунок 14 – Классификация биогазовых установок (по Ю.А. Горбунову)

Задание 4. Зарисовать таблицу 21.

Таблица 21 – Показатели выхода биогаза из навоза животных и птицы

Показатель	Молочные коровы	Птица	Свиньи
Выход навоза, кг/гол./сут.	55,0	0,2	3,5
Выход биогаза, $м^3$/гол./сут.	1,62	0,02	0,32
Объем биогаза, $м^3$ на 1 т сухого вещества навоза	300	600	500

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Биотехнология : учебник / А. Я. Самуйленко [и др.] ; под ред. А. Я. Самуйленко. – 2-е изд., перераб. – Москва, 2013. – 746 с.

2. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хиггинса, Д. Бест, Дж. Джонса. – Москва : Мир, 1988. – 473 с.

3. Основы генетической инженерии и биотехнологии / Ю. А. Горбунов [и др.]. – Гродно, 2016. – 344 с.

Дополнительная литература

4. Валюшкин, К. Д. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных / К. Д. Валюшкин, Г. Ф. Медведев. – Минск : Ураджай, 2001. – 869 с.

5. Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – Москва : Элевар, 2000. – 512 с.

6. Гудилин, И. И. Биотехнология переработки органических отходов и экология / И. И. Гудилин, А. Ф. Кондратов. – Новосибирск : Новосибирское книжное издательство, 1999. – 392 с.

7. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – Москва : Академия, 2008. – 208 с.

8. Новиков, Д. А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Курс лекций / Д. А. Новиков. – Минск : БГУ, 2014. – 235 с.

9. Самотруева, М. А. Фармацевтическая биотехнология. Ч. 1 / М. А. Самотруева, Б. В. Фельдман, А. А. Цибизова. – Астрахань : АГМА, 2013. – 148 с.

10. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.] – Москва : Высшая школа, 2003. – 709 с.

11. Воинов, Н. А. Трансгенные животные: технологии получения [Электронный ресурс] / Н. А. Воинов, Т. Г. Волова. – Режим доступа : https://medbe.ru/materials/problemy-i-metody-biotekhnologii/transgennye-zhivotnye-tekhnologii-polucheniya/. – Дата доступа : 03.10.2018.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

УО «ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины является старейшим учебным заведением в Республике Беларусь, ведущим подготовку врачей ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарных врачей, провизоров ветеринарной медицины и зооинженеров.

Вуз представляет собой академический городок, расположенный в центре города на 17 гектарах земли, включающий в себя единый архитектурный комплекс учебных корпусов, клиник, научных лабораторий, библиотеки, студенческих общежитий, спортивного комплекса, Дома культуры, столовой и кафе, профилактория для оздоровления студентов. В составе академии 4 факультета: ветеринарной медицины; биотехнологический; повышения квалификации и переподготовки кадров агропромышленного комплекса; довузовской подготовки, профориентации и маркетинга. В ее структуру также входят Аграрный колледж УО ВГАВМ (п. Лужесно, Витебский район), филиалы в г. Речице Гомельской области и в г. Пинске Брестской области, первый в системе аграрного образования НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии (НИИ ПВМ и Б).

В настоящее время в академии обучается более 4 тысяч студентов, как из Республики Беларусь, так и из стран ближнего и дальнего зарубежья. Учебный процесс обеспечивают около 330 преподавателей. Среди них 170 кандидатов, 27 докторов наук, 135 доцентов и 22 профессора.

Помимо того, академия ведет подготовку научно-педагогических кадров высшей квалификации (кандидатов и докторов наук), переподготовку и повышение квалификации руководящих кадров и специалистов агропромышленного комплекса, преподавателей средних специальных сельскохозяйственных учебных заведений.

Научные изыскания и разработки выполняются учеными академии на базе Научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии. В его состав входит 2 отдела: научно-исследовательских экспертиз (с лабораторией биотехнологии и лабораторией контроля качества кормов); научно-консультативный.

Располагая современной исследовательской базой, научно-исследовательский институт выполняет широкий спектр фундаментальных и прикладных исследований, осуществляет анализ всех видов биологического материала и ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок, что позволяет с помощью самых современных методов выполнять государственные тематики и заказы, а также на более высоком качественном уровне оказывать услуги предприятиям агропромышленного комплекса. Активное выполнение научных исследований позволило получить сертификат об аккредитации академии Национальной академией наук Беларуси и Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь в качестве научной организации. Для проведения данных исследований отдел научно-исследовательских экспертиз аккредитован в Национальной системе аккредитации в соответствии с требованиями стандарта СТБ ИСО/МЭК 17025.

Обладая большим интеллектуальным потенциалом, уникальной учебной и лабораторной базой, вуз готовит специалистов в соответствии с европейскими стандартами, является ведущим высшим учебным заведением в отрасли и имеет сертифицированную систему менеджмента качества, соответствующую требованиям ISO 9001 в национальной системе (СТБ ISO 9001 – 2015).

www.vsavm.by

210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, факс (0212) 51-68-38, тел. 53-80-61 (факультет довузовской подготовки, профориентации и маркетинга); 51-69-47 (НИИ ПВМ и Б); E-mail: vsavmpriem@mail.ru.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

ДЛЯ ЗАМЕТОК

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Учебное издание

Вишневец Андрей Васильевич,
Соболева Валентина Федоровна,
Видасова Татьяна Викторовна

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск А. В. Вишневец
Технический редактор Е. А. Алисейко
Компьютерный набор О. Л. Будревич
Компьютерная верстка Е. А. Алисейко
Корректор Т. А. Драбо

Подписано в печать 15.03.2019. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Усл. п. л. 4,31. Уч.-изд. л. 3,68. Тираж 120 экз. Заказ 1891.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 51-75-71.
E-mail: rio_vsavm@tut.by
http://www.vsavm.by

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ