

Міністерство освіти і науки, молоді та спорту України  
Державний заклад  
«Луганський національний університет  
імені Тараса Шевченка»

# ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

*Підручник  
для студентів освітнього рівня бакалавр  
спеціальності «Біологія»*

Луганськ  
ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка»  
2011

УДК 60(075.8)

ББК 30.16я73

О75

**Рецензенти:**

- Кірицьов І. В.** – доктор біологічних наук, професор кафедри фізіології і біотехнології рослин Луганського національного аграрного університету.
- Конопля М. І.** – доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри біології Луганського національного університету імені Тараса Шевченка.
- Петренко С. В.** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри екології, садово-паркового та лісового господарств Луганського національного університету імені Тараса Шевченка.

**О75** **Основи біотехнології** : підручник для студ. освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія» / уклад. Н. Ю. Мацай. – Луганськ : Держ. закл. «Луган. нац. ун-т імені Тараса Шевченка». – Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. – 153 с.

Підручник розроблено відповідно до програми курсу, який є одним зі складових у системі професійної підготовки фахівців-біологів. Містить загальні відомості про курс, теоретичний курс, який розподілено на два модулі, завдання та запитання, список літератури до кожної теми.

Призначено для студентів, які вивчають курс «Основи біотехнології».

УДК 60(075.8)

ББК 30.16я73

*Рекомендовано до друку навчально-методичною радою  
Луганського національного університету імені Тараса Шевченка  
(протокол № 6 від 2 березня 2011 р.)*

© Мацай Н. Ю., 2011

© ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕДМОВА</b> .....	7
<b>МАТЕРІАЛИ ДО ПЕРШОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ</b>	
<b>Тема №1: ВСТУП</b> .....	10
1. Біотехнологія як наука. Зв'язок біотехнології з іншими науками.....	10
2. Історія розвитку біотехнології .....	12
3. Перспективи розвитку і сучасний стан біотехнології .....	15
Питання та завдання до самоконтролю .....	18
Література .....	19
<b>Тема № 2: ОСНОВНІ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ</b> .....	20
1. Біотехнологічна стадія, її сутність та види.....	21
2. Види продуктів за їх місцем у типовій технологічній схемі.....	26
3. Приклади схем біотехнологічних виробництв.....	28
4. Екологічні аспекти біотехнологічного виробництва.....	34
Питання та завдання до самоконтролю.....	35
Література .....	36
<b>Тема № 3: ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ТА ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ</b> .....	37
1. Екологічна біотехнологія та її завдання. Біотрансформація ксенобіотиків та речовин, що забруднюють навколишнє середовище.....	37

2. Отримання екологічно чистої енергії.....	39
3. Очищення стічних вод.....	44
4. Біотехнологічні процеси в харчовій промисловості.....	47
Питання та завдання до самоконтролю.....	50
Література.....	52
<b>Тема № 4: БІОІНДУСТРІЯ ФЕРМЕНТІВ.....</b>	<b>53</b>
1. Використання та джерела ферментів.....	53
2. Технологія одержання ферментних препаратів.....	55
3. Інженерна ензимологія.....	57
Питання та завдання до самоконтролю.....	64
Література.....	66
<b>Тема № 5: БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА МЕТАБОЛІТІВ.....</b>	<b>67</b>
1. Механізми одержання продуктів клітинного метаболізму.....	67
2. Біотехнологія одержання первинних метаболітів.....	69
3. Біотехнологія одержання вторинних метаболітів.....	75
Питання та завдання до самоконтролю.....	77
Література.....	78
<b>ПИТАННЯ ДО ПЕРШОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ.....</b>	<b>79</b>
<b>МАТЕРІАЛИ ДО ДРУГОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ</b>	
<b>Тема № 6: ОСНОВИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....</b>	<b>81</b>
1. Біотехнологія рекомбінантних ДНК та їх конструювання.....	82

2. Клонування та експресія чужорідних генів у різних організмах.....	87
3. Використання генетичної інженерії.....	93
Питання та завдання до самоконтролю.....	104
Література.....	105
<b>Тема № 7: ОСНОВИ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....</b>	<b>106</b>
1. Історія одержання культури клітин і тканин.....	106
2. Методи та умови культивування культури клітин і тканин.....	107
3. Типи культур клітин та тканин.....	110
Питання та завдання до самоконтролю.....	112
Література.....	113
<b>Тема № 8: ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР КЛІТИН ТА ТКАНИН І ШЛЯХИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ.....</b>	<b>114</b>
1. Загальна характеристика калусних клітин. Диференціювання як основа калусогенезу.....	114
2. Морфогенез, гістогенез, органогенез калусних тканин.....	117
3. Ізольовані протопласти, їх одержання та культивування. Використання методу культури клітин і тканин в утворенні сучасних технологій. Кріозбереження.....	119
Питання та завдання до самоконтролю.....	128
Література.....	129
<b>Тема № 9: БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОБЕЗПЕКА.....</b>	<b>130</b>
1. Поняття про безпеку.....	130
2. Державний контроль та регулювання в галузі генно-інженерної діяльності. Нормативні документи біотехнологічних виробництв.....	134

3. Перспективи та проблеми розвитку біотехнології у світі та в Україні .....	136
Питання та завдання до самоконтролю.....	139
Література.....	139
<b>ПИТАННЯ ДО ДРУГОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ.....</b>	<b>140</b>
<b>СЛОВНИК ОСНОВНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ТЕРМІНІВ.....</b>	<b>142</b>
<b>РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>150</b>
<b>ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>152</b>

## ПЕРЕДМОВА

Біотехнологія – це сучасна наука, яка розвивається на межі різних дисциплін: біохімії, мікробіології, клітинної та молекулярної біології, генетики тощо.

Сьогодні біотехнологія охоплює різні сфери людської діяльності – медицину, промисловість, сільське господарство. Розвиток біотехнології дозволяє значно інтенсифікувати виробництво, збільшити ефективність використання природних ресурсів, утворювати нові джерела енергії, вирішувати продовольчі та екологічні проблеми тощо.

Усі напрями біотехнологічних виробництв засновані на використанні цілих організмів або його частин в умовах *in vitro*.

Курс „Біотехнологія” є однією з узагальнюючих дисциплін, яка передбачає наявність у студентів достатнього обсягу знань в галузі біохімії, молекулярної біології, генетики, фізіології рослин, мікробіології, вірусології. Обсяг і зміст курсу біотехнології повинен слугувати основою для подальшого вивчення студентами інших загальнобіологічних дисциплін.

Основною *метою* курсу є поглиблення знань студентів з традиційних та новітніх біотехнологічних напрямів, тобто вивчення основних проблем, методів, сутності та досягнень використання біооб’єктів у різних технологічних процесах виробництв.

До *завдань* курсу належить вивчення основних розділів біотехнології, їх сутності, принципів, методів; ознайомлення з сучасними досягненнями біотехнології, галузями її застосування, проблемами та перспективами біотехнологічної науки.

У результаті вивчення курсу студент повинен *знати*:

– особливості науки біотехнології, відмінності класичної та сучасної біотехнології, особливості та сутність етапів

становлення науки біотехнології, особливості сучасного стану біотехнології та перспективних сфер використання її досягнень;

- сутність схем, стадій, процесів біотехнологічних виробництв, види продуктів за їх місцем у типовій технологічній схемі, основні закономірності складання окремих схем біотехнологічних виробництв;

- поняття екологічна біотехнологія, харчова біотехнологія, основні напрями використання біотехнологічних процесів для вирішення проблем екологічного характеру та харчової промисловості;

- основні джерела ферментів та можливі шляхи їх використання; характеристики технологічних етапів одержання ферментних препаратів із різних джерел, поняття інженерна ензимологія, особливості процесу та методів іммобілізації ферментів, клітинних структур та клітин, сутність великомасштабних виробничих процесів з використанням іммобілізованих ферментів та клітин;

- сутність реакцій біотрансформації, шляхи забезпечення надсинтезу одного з продуктів метаболізму та шляхи координації всіх хімічних перетворень у клітині;

- основні методи генетичної інженерії, особливості систем перенесення генетичного матеріалу, характеристику клонування генів та процесів їх ідентифікації та експресії, основні напрями використання досягнень генетичної інженерії у різних сферах;

- поняття культура клітин та тканин, особливості культивування об'єктів у культурі *in vitro*, основні вимоги до лабораторії, де вирощують культури *in vitro*, особливості методів стерилізації, підбору поживних середовищ та умов культивування, характеристику наявних класифікацій культур клітин та тканин за різними ознаками;

- основні характеристики калусних клітин, особливості дедифференціровки як основи калусогенезу, сутність морфогенезу, гістогенезу та органогенезу; напрями використання методу ізольованих клітин і тканин у сучасних технологіях, одержанні штучних систем;



– поняття безпека та біобезпека, особливості біобезпеки в різних напрямках біотехнології, сутність державного контролю та регулювання в галузі генно-інженерної діяльності, основні проблеми розвитку біотехнології у світі та Україні.

Підручник розроблено відповідно до програми курсу „Основи біотехнології”, який є одним зі складових у системі професійної підготовки фахівців-біологів. Підручник містить теоретичний курс, який розподілено на два модулі. До кожної теми запропоновано завдання та запитання до самоконтролю, список літератури.

# МАТЕРІАЛИ ДО ПЕРШОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ

## Тема № 1: ВСТУП

**Мета:** визначити наукове поняття „біотехнологія”, основні відмінності класичної та сучасної біотехнології. Розглянути історичні періоди її розвитку. Дати загальну характеристику сучасного стану біотехнології та перспективних сфер використання її досягнень.

- 1. Біотехнологія як наука. Зв’язок біотехнології з іншими науками.**
- 2. Історія розвитку біотехнології.**
- 3. Перспективи розвитку і сучасний стан біотехнології.**

**1. Біотехнологія як наука. Зв’язок біотехнології з іншими науками.** Сучасна біотехнологія як наука виникла у 40-х рр. ХХ сторіччя і отримала прискорений розвиток з 1953 році, коли Х. С. Морган відкрив ДНК.

Біотехнологія як наука може розглядатися у двох часових і реальних вимірах:

– класична біотехнологія – наука про методи й технології виробництва, транспортування, переробку сільськогосподарської та іншої продукції з використанням природних і селекційних (нетрансгенних) рослин, тварин і мікроорганізмів, у природних і штучних умовах;

– сучасна біотехнологія – наука про генно-інженерні та клітинні методи й технології вироблення і використання генетично-трансформованих (модифікаційних) рослин, тварин і мікроорганізмів з метою інтенсифікації виробництва й отримання нових видів продуктів різного походження.

Трансформовані організми (трансгенні, генетичні, модифіковані) – це рослини, тварини, мікроорганізми, віруси зі зміненою спадковістю, викликаною включенням у їх геном

чужорідних генів, за допомогою генно-інженерних методів.

За масштабом біотехнологічного виробництва їх поділяють на великомасштабні та дрібномасштабні.

До появи терміна „біотехнологія”, для визначення найбільш тісно пов’язаних з біологією технологій використовувалися такі назви, як прикладна мікробіологія, прикладна біохімія, технологія ферментів, біоінженерія, прикладна генетика, прикладна біологія. Усі ці перелічені напрямики сьогодні є складовими частинами біотехнології.

Навизку чи знайдеться інша, крім біотехнології, наука, до якої б більше підходили такі слова, вимовлені Л. Пастером у 1871 році: „Ні, і ще тисячу разів ні, – я не знаю такої науки, котру можна було б назвати прикладною. Є наука і є галузі її використання, і вона пов’язана одна з одною, як плід з деревом, який його виростив”.

Біотехнологія – комплексна наука, яка характеризується складними міждисциплінарними зв’язками з такими науками як: мікробіологія, генетика, біохімія, хімія, основи отримання харчових продуктів, технологія харчової промисловості, механічна технологія, хімічна технологія, біохімічна технологія, електроніка та інші.

Важливе значення, останнім часом у розвитку біотехнології набули нові результати отримані в генній інженерії (технологія здобуття рекомбінації ДНК, трансгенні організми), біокаталіз ферментів (їх виділення, іммобілізація, стабілізація), іммобілізація цілих клітин мікроорганізмів та макроорганізмів (їх виділення, іммобілізація, стабілізація), технологія ферментації (виробництво, переробка відходів), біоелектроніка.

Найважливішими напрями сучасної біотехнології є:

– генетична трансформація (стратегічний напрям у біотехнології) містить перенесення іншопохідних природних або штучно створених донорських генів у клітині-реципієнта рослин, тварин, мікроорганізмів, отримання трансгенних організмів з новими або підсиленими властивостями та показниками;

- клітинна інженерія (з 50-х рр. ХХ століття) – сукупність прийомів, засобів та технологій отримання модифікованих мутагенних клітин та їх варіація;
- генетична інженерія (з 70-х рр. ХХ століття) – сукупність прийомів, засобів і технологій отримання рекомбінаційних РНК і ДНК, виділення генів із організму, здійснення маніпуляцій з ними й уведення їх в інші організми;
- одержання рекомбінатної ДНК, яка складена з ділянок різних початкових молекул ДНК;
- імунологічна біотехнологія – розпізнання і виділення клітин захисної системи організму, отримання препаратів, які синтезують ці клітини;
- протоінженерія – технологія зміни властивостей природних білків на генетичному рівні для отримання нових білків;
- біоелектроніка – використання біосенсорів для вимірювання і контролю в різних напрямках промисловості, медицини, наукових дослідженнях;
- біоенергетика – використання закономірностей перетворення енергії в процесах життєздатності організмів.

**2. Історія розвитку біотехнології.** З біотехнологічними процесами наші предки були знайомі тисячі років. Вони використовували їх для зберігання та одержання харчових продуктів тощо.

До найдавніших галузей людської діяльності належать хлібопечення, виноробство, пивоваріння, які у своїй основі мають використання хлібопекарських і винних дріжджів, одержання кисломолочних продуктів, сирів за допомогою молочнокислих бактерій, харчового оцту за допомогою оцтовокислих бактерій. Наслідки такого виду діяльності були виявлені у стародавніх народів, які жили близько 8 тисяч років тому. З тих пір, як були відкриті мікроорганізми та визначено їх фізіологічні особливості, практичне використання мікробів стало усвідомленим, було поставлено на промислову основу й отримало бурхливий розвиток.

Промисловому використанню мікроорганізмів заважала

відсутність спеціальної апаратури й технологій. Технологія – це сукупність способів, прийомів для отримання з вихідного матеріалу (сировини) певного практично цінного продукту.

Усі основні технології можна розподілити на три основні групи:

- фізико-механічні технології – вихідний матеріал (сировина) у процесі одержання продукту змінює форму або агрегатний стан, але не змінює свого хімічного складу;

- хімічні технології – у процесі одержання продукту сировина зазнає змін хімічного складу (виробництво з природного газу, спирту, поліетилену, отримання барвників та багатьох ліків з простих хімічних сполук (кислоти, лугів, бензолу та ін.);

- біотехнології – це процеси використання живих організмів чи їх компонентів для одержання продукту.

Як науковий термін „біотехнологія” був уперше впроваджений у 1919 році угорським вченим К. Ерекі для визначення тих процесів при яких продукцію отримують за допомогою живих організмів. Стрижнем біотехнології є генетика, мікробіологія, біохімія, інженерні науки.

Необхідність виникнення цієї науки була викликана появою, наприкінці XIX століття, цілої низки глобальних проблем – дефіцит харчового білка, швидке витрачання природних ресурсів, енергетична криза, антропогенне забруднення навколишнього середовища та інші.

Першим поштовхом до розвитку біотехнології було відкриття біологічних основ бродіння Л. Пастером у середині XIX століття, що дало можливість більш інтенсивному розвитку певних напрямів харчової промисловості (виноробство, пивоваріння).

Крім того, на основі цих досліджень наприкінці XIX – початку XX ст., почало розвиватися бродильне виробництво органічних розчинників (ацетон, етанол, бутанол та інші).

Наступним напрямом у біотехнології було використання мікроорганізмів для очищення стічних вод. У 1914 році XX століття було запропоновано засіб мінералізації органічних речовин стічних вод за допомогою активного мулу, який

становить собою комплекс різних мікроорганізмів.

З 1940 році XX століття, коли було відкрито хіміотерапевтичну дію пеніциліну, розпочалася організація промислового виробництва антибіотиків.

У цей же період розвивається ще один напрям біотехнології – отримання біогазу ( $\text{CO}_2 + \text{CH}_4$ ), при переробці стоків, відходів сільського господарства, в анаеробних умовах. Одержання біогазу за цим методом є досить перспективним, так у Китаї у 80-х рр. XX століття одержували близько 18 мільйонів куб. м біогазу.

Після Другої Світової війни розвивалися перелічені вище виробництва та процеси, а також розроблялися нові, які ми будемо вивчати в наступних розділах. Найбільш цікавими з них є:

– розробка процесів одержання харчових продуктів з високим вмістом білка із рослинної біомаси з низьким його вмістом або з нафти, метану, метанолу (у Німеччині під час Другої Світової війни для підвищення вмісту білка в супи та ковбаси додавали дріжджі);

- з 60-х рр. XX століття розпочато одержання із метанолу білка прутину (використовується для харчування тварин);

- перетворення стероїдів, засноване на використанні ферментів, які здійснюють високоспецифічні реакції (завдяки цьому методу при використанні ферменту гриба Ризопуса, який гідроксує гормон прогестерон за 11-м положенням, було одержано препарат кортизон, при цьому ціна препарату суттєво знизилася з 200 доларів – ціни при хімічному до 0,68 центів – ціни при біотехнологічному виробництві; за цим методом також виробляють протизачаткові засоби).

– використання методів культивування окремих рослинних і тваринних клітин різних ліній (за цими методами були одержані високопродуктивні клони олійних пальм).

Новий спалах досліджень по біотехнології в світовій практиці виник у 80-ті рр. XX століття. Причиною цього було розроблення нових методологічних та методичних підходів. У СРСР у цей період були розроблені та активно впроваджені програми з біотехнології, створено 15 біотехнологічних центрів

в АПК, здійснювалася підготовка кваліфікованих кадрів, були організовані лабораторії та кафедри в селекційних центрах, НДІ, ВНЗ.

В умовах розпаду СРСР увагу до біотехнології було втрачено, фінансування зменшено, що призвело до відставання від світового рівня.

Крім того, у цей період в Західній Європі та Америці розпочався рух протесту проти розвитку окремих напрямів біотехнології.

Основою цих рухів постало нерозуміння сутності біотехнології, її можливі зв'язки з поширенням нових інфекційних хвороб, можливість одержання неправних мутантів, аналогія окремих продуктів біотехнології з ядерною енергією.

Сьогодні в розвитку біотехнології нашої країни реалізується програма розвитку та подолання відставання, яке виникло внаслідок економічної кризи 90-х рр. ХХ століття, яка містить:

- установа контактів з ученими міжнародних біотехнологічних центрів (США, Англія, Японія, Італія, Індія, Китай);
- забезпечення державної підтримки;
- підвищення рівня свідомості та освіти громадян, розробка та введення правових актів;
- розроблення найсучасніших біотехнологічних напрямів та упровадження їх у виробництво;
- розроблення найсучасніших методів стандартизації та сертифікації продуктів біотехнологічних виробництв.

**3. Перспективи розвитку і сучасний стан біотехнології.** Основне призначення біотехнології – це підвищення рівня життя людини за рахунок застосування нових товарів та послуг, підвищення їх якості та зниження цін.

Порівняно з хімічними технологіями біотехнології мають багато переваг:

- можливість отримання специфічних та унікальних природних речовин (білки, ДНК ще не вдається отримати

шляхом хімічного синтезу);

- проведення біотехнологічних процесів при порівняно невисоких температурах і тиску;

- висока швидкість росту мікроорганізмів, яка багато разів перевищує швидкість росту тварин і рослин;

- як сировину в процесах біотехнології можна використовувати дешеві відходи сільського господарства та промисловості;

- біотехнологічні процеси порівняно з хімічними звичайно більш екологічні, мають менше шкідливих відходів, близькі до процесів, які є природними;

- у більшості технологія й апаратура в біотехнологічних виробництвах значно простіші й дешевші.

Утілення біотехнології в практику, за рахунок підвищення виробництва, змінює відношення в системі:

**людина → виробництво → природа.**

Сьогодні основними сферами використання методів біотехнології є розробка та виробництво засобів для аналітичної хімії, процесів біосинтезу та біодеградації, ефективних методів хімічної переробки та очищення, продуктів харчування та побуту (волокна, смакові добавки, пахучі речовини, пігменти, пластики та інше), нових та перспективних джерел енергії, методів контролю за станом навколишнього середовища, нових харчових продуктів та напоїв (сільськогосподарських виробництв та їх переробки), методів охорони здоров'я та профілактики (засоби діагностики, лікування, боротьби із захворюваннями), видобування мінеральної сировини на суші та морі.

Використання процесів біотехнологічних виробництв у різних сферах є дуже перспективним та різноманітним. Розглянемо найважливіші з них за сферами.

У медицині велике значення має використання рекомбінантної ДНК для отримання препаратів інтерферону людини, інсуліну, гормону росту та очищення медичних препаратів завдяки методами клонування генів людини в мікроорганізмах. На основі методів біотехнології розроблено зонди для ідентифікації особливостей клітин



людського організму, методи та біорецептори для діагностики вагітності, раку, виявлення кількості антигенів та засобів терапії за рахунок спрямованого перенесення токсинів у ракові клітини тощо.

У біоелектрохімії та біоелектроніці велике значення має використання ферментних систем для одержання окремих продуктів – електродів, на які нанесено біологічні системи, приладів для визначення вмісту глюкози, визначення окремих компонентів крові.

У харчовій промисловості найбільш важливим є використання різних типів бродіння, розвиток напряму добування білка, утвореного різними організмами або їх частинами, одержання різноманітних смакових добавок. Перспективним є виробництво харчів у біореакторах.

Для розвитку енергетики велике значення має можливість добування у біореакторах, на базі фотосистем водню, при фотолізі води, підвищення біоконверсії в біомасі, розробки біопаливних елементів для добування при звичній температурі з біомаси електричної енергії, розробки нафтових пластів та кінцевому добування нафти за рахунок мікроорганізмів, які виробляють речовини, котрі закачують у нафтовий пласт для легшого відтоку нафти.

У хімічній промисловості з використанням біологічних засобів виробляють різні спирти, карбонові кислоти, амінокислоти, стероїди. Велике значення має використання біокаталізу при виробництві більшості продуктів із нафти шляхом неповного окислення. Існує три варіанти біокаталізу: з використанням культурних клітин рослин і тварин, що виробляють речовини; з використанням мікроорганізмів, інколи модифікованих, для біосинтезу або модифікацій хімічних сполук, з використанням мікроорганізмів для експресії генів тварин і рослин, що дозволяє синтезувати властиві їм речовини.

У виробництві матеріалів перспективним є збільшення здатності видобутку сировини (нафта, корисні копалини), розробка методів захисту різних матеріалів від розкладання та корозії (змазка, асфальт, метали), використання продуктів

мікробного походження (емульгатори), розробка показників для визначення мікробного забруднення сировини.

У напрямкі охорони навколишнього середовища найголовнішим є розробка методів переробки незвичайних, небезпечних відходів та відходів масового виробництва.

У сільському господарстві перспективними та необхідними напрямками є переробка низькоякісного вина на спирти, одержання паливного газу із гною, ветеринарних сироваток, вакцин, використання гормонів росту для збільшення виходу м'яса, одержання заміників добрив і пестицидів.

### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Схарактеризуйте відмінності сучасної та класичної біотехнології.

2. Виділіть основні періоди розвитку біотехнології та схарактеризуйте їх.

3. Установить зв'язок періодів розвитку біотехнології з найбільш важливими відкриттями в інших науках.

4. Перерахуйте та схарактеризуйте напрями сучасної біотехнології.

5. Заповніть таблицю: „Основні сфери використання досягнень біотехнології” (табл.1.1).

*Таблиця 1.1*

### **Основні сфери використання досягнень біотехнології**

<b>Сфера використання</b>	<b>Досягнення та перспективи використання</b>
медицина	
біоелектрохімія	
біоелектроніка	
харчова промисловість	
енергетика	
хімічна промисловість	
виробництво матеріалів	
охорона навколишнього середовища	
сільське господарство	

6. Схарактеризуйте сучасний стан розвитку біотехнології у світі та в Україні.

#### **Література:**

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988. – 479 с.
2. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолоС, 2004. – 296 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
4. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.
5. Сазыкин Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Изд. центр „Академия”, 2007. – 256 с.

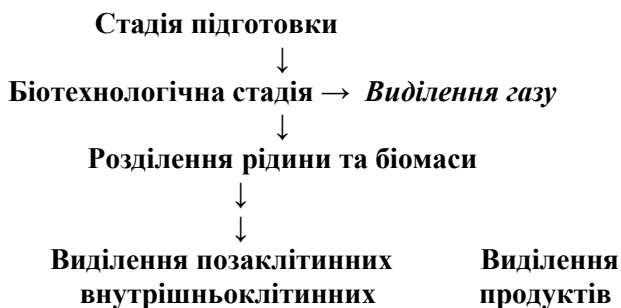
## **Тема № 2: ОСНОВНІ СТАДІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ**

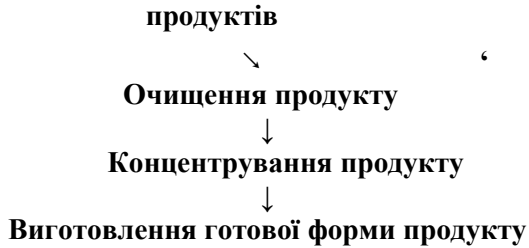
**Мета:** вивчити поняття схеми, стадії, процеси біотехнологічних виробництв. Визначити види продуктів за їх місцем у типовій технологічній схемі. Схарактеризувати основні закономірності складання окремих схем біотехнологічних виробництв на запропонованих прикладах.

- 1. Біотехнологічна стадія, її сутність та види.**
- 2. Види продуктів за їх місцем у типовій схемі.**
- 3. Приклади схем біотехнологічних виробництв.**
- 4. Екологічні аспекти біотехнологічного виробництва.**

Усі продукти біотехнологічних виробництв одержують за індивідуальними технологіями зі своїми біологічними об'єктами, сировиною, кількістю стадій та технологічних режимів. Але можна скласти загальну, типову схему майже всіх біотехнологічних виробництв.

Схема складається зі стадій, у кожній із яких сировина витримує окремі технологічні перетворення, послідовно перетікаючи в більш важливі продукти і, наприкінці, у кінцевий продукт. Загальний вид такої схеми такий:





### **1. Біотехнологічна стадія, її сутність та види.**

Основною стадією біотехнологічного виробництва є *біотехнологічна стадія*, сутність якої полягає в перетворенні субстрату за участю біологічного об'єкта (мікроорганізмів, ізольованих клітин, ферментів або клітинної органели), у необхідний продукт. Тобто, головним завданням біотехнологічної стадії є одержання окремої органічної речовини. Ця стадія містить низку різних біотехнологічних процесів:

- ферментація – процес, який здійснюється за допомогою культивування мікроорганізмів;

- біотрансформація – процес змінення хімічної структури речовини під дією ферментативної активності клітин мікроорганізмів або готових ферментів. У цьому процесі відбуваються незначні змінення у структурі речовини. Воно майже готове, але йде його хімічна модифікація (додавання або віднімання радикалів, гідроксильних іонів, дегідратації та інше). Накопичення клітин мікроорганізмів не здійснюється;

- біокаталіз – хімічні перетворення речовини, які протікають з використанням біокаталізаторів – ферментів.

- біоокислення – перетворення забруднених речовин за допомогою мікроорганізмів або асоціації мікроорганізмів в анаеробних умовах;

- метанове бродіння – переробка органічних відходів за допомогою асоціації метаногених мікроорганізмів в анаеробних умовах.

- біокомпостування – зниження вмісту шкідливих органічних речовин за допомогою асоціації мікроорганізмів, у твердих відходах, котрим надана спеціальна пухка структура,

для забезпечення доступу кисню і рівномірної вологості;

– біосорбція – сорбція шкідливих домішок із газів або рідини мікроорганізмами, які закріплені на спеціальних твердих поверхнях;

– біодеградація – деструкція шкідливих зв'язків під дією мікроорганізмів-біодеструкторів.

– бактеріальне вилуджування – процес переводу нерозчинних у воді зв'язаних металів у розчинений стан під дією спеціальних мікроорганізмів.

Вихідними потоками біотехнологічної стадії, звичайно, є один рідинний і один газовий, рідше – один рідинний, в окремих випадках – один потік твердого продукту (наприклад, при дозріванні сиру, біокомпостуванні відходів).

Біотехнологічну стадію випереджує стадія *підготовки сировини та набуття необхідного їй виду*. На стадії підготовки використовують такі процеси:

– виготовлення середовища – у більшості рідкого, яке вміщує необхідні компоненти для харчування біотехнологічних об'єктів для біотехнологічної стадії;

– стерилізація середовища – для асептичних біотехнологічних процесів, де попадання сторонньої мікрофлори не бажане.

Підготовка до стерилізації газів (зокрема, повітря), є необхідною для протікання біотехнологічного процесу. Найчастіше підготовка повітря містить очищення його від пилу, вологи, мікроорганізмів та їх спор, надання необхідної температури.

Підготовка посівного матеріалу для проведення мікробіологічного процесу, процесу культивування відокремлених клітин рослин або тварин полягає у вирощуванні малої кількості матеріалу, порівняно з кількістю біологічного агента цільової стадії.

Підготовка біокатализатора зводиться до попередньої підготовки біокатализатора, ферменту у вільному або закріпленому на носії виду або вирощуванні мікроорганізмів до стану, у якому проявляється їх ферментативна активність.

Використовується в процесах біотрансформації і

біокаталіз.

Попередня обробка сировини здійснюється тоді, коли поступивша сировина, що надійшла непридатна для використання в біотехнологічному процесі (при добуванні спирту пшеницю спочатку подрібнюють, потім ферментативно „цукрують” для отримання цукрового суслу; при використанні деревини для отримання дріжджів її подрібнюють, потім нагрівають до 200 °С у кислому середовищі, у результаті чого здійснюється гідроліз деревини до глюкози та лігніну).

Розглянемо стадію, наступну за біотехнологічною – *розділення рідини й біомаси*. Для цього в залежно від властивостей біомаси й рідини використовують різні процеси:

– відстоювання - розділення під дією гравітаційних сил (при очищенні стічних вод);

– фільтрація – пропускання суспензії крізь фільтруючий матеріал, на якому затримуються частки твердої фази – біомаса (виробництво антибіотиків);

– сепарація, центрифугування – розподіл під дією центробіжних сил (виробництво кормової біомаси – дріжджів, бактерій).

– мікрофільтрація, ультрафільтрація – пропускання суспензії крізь мембрани з малим діаметром пор, котрі забезпечують утримання клітин мікроорганізмів; ультрафільтрація забезпечує затримання крупних молекул розчинних речовин;

– коагуляція – додавання до суспензії реагентів, які допомагають осадженню більш крупних клітинних агрегатів і відділенню їх із рідини шляхом відстоювання;

– флотація – захоплення біомаси мікроорганізмів кульками піни і виділення їх із пінної фракції.

*Виділення продуктів біосинтезу*. Ця стадія залежить від місця локалізації продукту – внутріклітинного або неклітинного.

Для внутріклітинних продуктів спочатку здійснюють руйнування клітинної оболонки одним із таких методів:

Дезінтеграція клітин – руйнування клітинної оболонки

фізичними методами – роздавлюванням, дією ультразвуку методом різкого зниження тиску (декомпресією) або хімічними й біотехнічними методами. Найбільш часто використовують:

- ферментоліз – руйнування клітинних оболонок під дією ферментів при підвищеній температурі.

- гідроліз – руйнування клітинних оболонок під дією хімічних реагентів та температур.

- автоліз – різновидність ферментолізу, коли використовують ферменти цієї ж клітини.

Після проведення попередньої операції руйнування клітин, виділення цільового продукту здійснюється із розчину методами, котрі є загальними для позаклітинних і внутрішньоклітинних продуктів і містять такі методи:

- екстракція – перехід цільового продукту з водної фази в незмішану з водою органічну рідину (екстрагент – бензин, хлороформ, ефір, бутилацетат). Екстракція прямо із твердої фази (зокрема їх біомаси мікроорганізмів) має назву екстрагування;

- осадження - виділення цільового продукту шляхом додавання до рідини реагенту, який взаємодіє з розчиненим продуктом, переводячи його в тверду фазу;

- адсорбція – переведення розчиненого в рідині продукту в тверду фазу шляхом його сорбції на спеціальних твердих носіях (сорбентах);

- іонний обмін – такий же, як і адсорбція, але в цьому випадку в тверду фазу переходять іони (катіон та аніон), а не цілком молекула цільового продукту або домішок;

- відгін, ректифікація – ці методи використовують для виділення розчинених у культуральній рідині легко киплячих продуктів (етиловий спирт);

- ультрафільтрація, нанофільтрація і повернений осмос – використовують для виділення високомолекулярних з'єднань (білків, поліпептидів, полінукліотидів). Нанофільтрація і повернений осмос дозволяють відокремити також невеликі за розміром молекули;

- центрифугування, ультрацентрифугування – використовують для виділення вірусів, клітинних органел,



високомолекулярних з'єднань.

На цій стадії виділення продукту головне завдання – відокремити головну частину продукту, можливо неочищеного, с певними домішками. У випадку, коли необхідно отримати біопродукт високої якості, додають ще стадію очищення продукту.

*Очищення продукту.* Завдання цієї стадії – видалення домішок та одержання максимально чистого продукту.

Для цього використовують процеси, багато з яких ми розглянули, це – екстракція, екстрагування, адсорбція, іонний обмін, ультрафільтрація, повернений осмос, ректифікація і ферментоліз.

Крім цих процесів використовується:

– хроматографія – процес, який нагадує адсорбцію, але відрізняється тим, що на твердому сорбенті відокремлюється кілька здебільш близьких за структурою речовин (суміші білків, нуклеотидів, цукрів, антибіотиків) і виходять вони з сорбенту ніби разом, що дозволяє їх розділити й очистити один від одного;

– діаліз – процес, у якому крізь напівпроникну перегородку можуть проходити низькомолекулярні речовини, а високомолекулярні залишаються (очищення вакцин і ферментів від солі й низькомолекулярних розчинних домішок);

– кристалізація – процес, що ґрунтується на різній розчинності речовини при різних температурах. Повільніше охолодження дозволяє формувати кристали високої чистоти (розчинів у воді або розчинників) збільшують чистоту продукту.

*Концентрування продукту.* Після очищення продукту він часто перебуває у розчині в невеликій концентрації. Наступне завдання – концентрування.

На різних біотехнологічних стадіях концентрація цільового продукту змінюється таким чином: не виходячи з біотехнологічної стадії суспензія має приблизно 0,1–1% цільового продукту, після стадії відокремлення біомаси – 0,1–2%, після стадії виділення – 1–10%, після очищення – 50–80%, після концентрування – 90–100%.

На стадії концентрування використовують випарювання,

сушення, осадження, кристалізацію з фільтрацією добутих кристалів, ультрафільтрацію, нанофільтрацію, „віджимання” розчинника з розчину.

*Добуток готової форми продукту.* Кінцева стадія, на якій продукт набуває товарної форми, за рахунок таких процесів, як гранулювання (формування прямо з розчину), таблетування, розлив або фасування, ампулювання.

Таким чином ми розглянули загальну схему біотехнологічного виробництва.

Це виробництво на окремих стадіях має певні стоки і викиди в атмосферу. Очищення стоків – це окреме біотехнологічне виробництво, яке має велику кількість стадій (підготовчу, біотехнологічну, відстоювання, додаткове очищення, переробку осадку). Очищена вода може повертатися у виробництво.

**2. Види продукту за його місцем у типовій технологічній схемі.** Продукти біотехнології відрізняються не тільки кольором, смаком, запахом, хімічним складом, але й місцем, яке посідають у типовій технологічній схемі.

За цією ознакою продукти кваліфікують таким чином:

1. Продуктом є гази зі стадії ферментації ( $\text{CO}_2$  у спиртовому виробництві, біогазу в переробці відходів шляхом метанового бродіння,  $\text{H}_2$  при культивуванні фототрофів, очищений газ, коли його пропускають крізь біофільтр).

2. Продукт – середовище ферментації (культуральна рідина разом з мікроорганізмами – кефір, йогурт; твердий субстрат – сир або ферментована із закваскою ковбаса).

3. Концентрат культуральної рідини – випарений або висушений (кормовий лізин, харчові антибіотики).

4. Рідина, що виникає після відділення біомаси від культуральної рідини (може бути готовим продуктом – пиво, вино, квас). Ця рідина має назву залежно від засобу розділення – висвітлена, фільтрат та інше.

5. Концентрат рідини, який добувають випарюванням, сушенням, ультрафільтрацією.

6. Біомаса інактивована (харчові дріжджі, які пройшли теплову стерилізацію).

7. Біопрепарат – життєздатна біомаса мікроорганізмів (пекарські дріжджі, бактеріальні речовини захисту рослин, силосні закваски, бактеріальні добрива).

8. Послаблена біомаса мікроорганізмів – (живі вакцини – клітини патогенних мікроорганізмів, які піддаються обробці теплими або хімічними реагентами для зниження їх патогенності).

9. Позаклітинний біопродукт – легкокипляча рідина (етанол, виділений із середовища відгонкою або ректифікацією).

10. Позаклітинний біопродукт – тверда речовина або висококипляча рідина, розчинена в культуральній рідині (багато антибіотиків, чисті харчові або медичні амінокислоти, лимонна кислота).

11. Внутрішньоклітинний продукт різного ступеня очищення (антибіотики, вітаміни, нукліотиди).

12. Перероблена біомаса мікроорганізмів (гідролізати, фірменталізатори як джерело харчування тварин або смакові добавки; клітинні оболонки мікроорганізмів використовують як сорбент для очищення соків, вина).

13. Очищений від забруднення потік рідини (при очищенні стічних вод).

14. Очищене від забруднення тверде середовище (грунт при мікробіологічному очищенні його від нафтових забруднень).

15. Рідке середовище (культуральна рідина) з екстрагованими (вилуженими) з твердої фази компонентами (бактеріальне вилужування металів із руд, мікробіологічне знесірчення вугілля та нафти)

16. Середовище ферментації (як правило, напівтверде), яке збільшило свій обсяг за рахунок виділення газів мікроорганізмами (хліб, сир).

Для багатьох перерахованих видів продукту технологічна схема буде скорочена, за винятком однієї або кількох стадій. Це встановлюється:

– цільовим завданням;

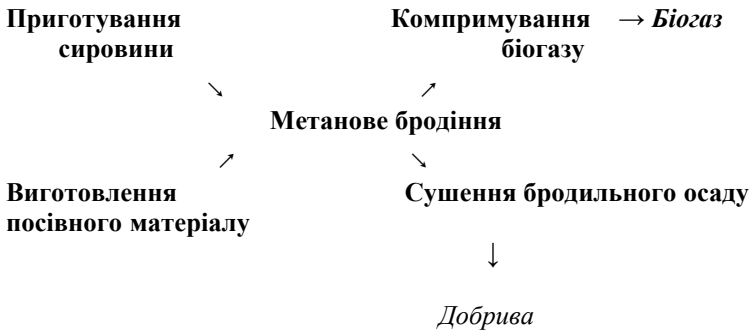
- властивостями мікроорганізмів;
- властивостями сировини;
- властивостями готового продукту.

### 3. Блок-схеми біотехнологічних виробництв.

Блок-схема відображає послідовність технологічних стадій при одержанні продукту.

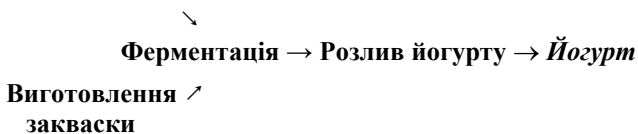
*Виробництво біогазу.* Блок-схема цього процесу значно коротша ніж загальна типова схема.

У цьому процесі є дві підготовчі стадії: стадія метанового бродіння (біотехнологічна), сушення як стадія концентрування, компримування біогазу як утворення його готової форми, підготовка сировини.



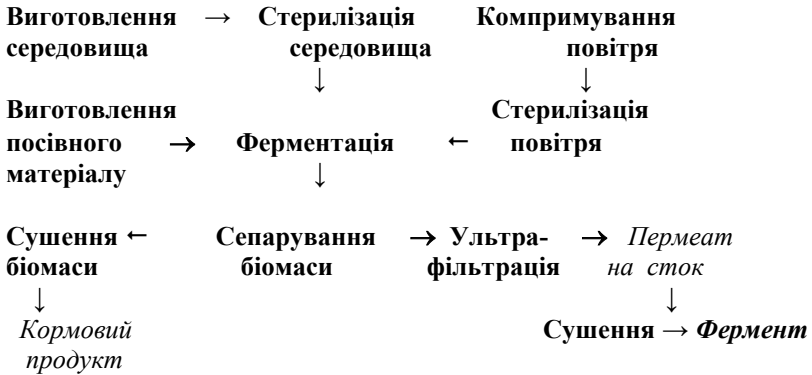
*Виробництво йогурту.* У виробництві йогурту є дві підготовчі стадії: одна біотехнологічна, інша – стадія приведення продукту до готової форми (розлив).

#### Пастеризація молока





ферментації:



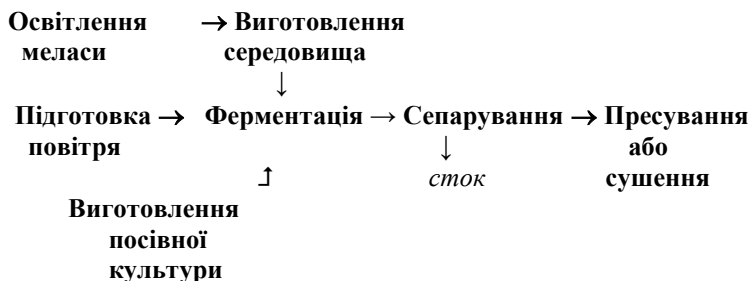
*Виробництво наприну (харчових дріжджей)* містить собою одержання інактивованої біомаси, тому до схеми включено, крім сепарації, ще процес теплової стерилізації. Особливістю цього процесу є також повернення у ферментер фугата, відпрацьованої культуральної рідини – ВКР. У результаті цього на стадії сепарації процес здійснюється без стоків.

**Виготовлення солей розчину**

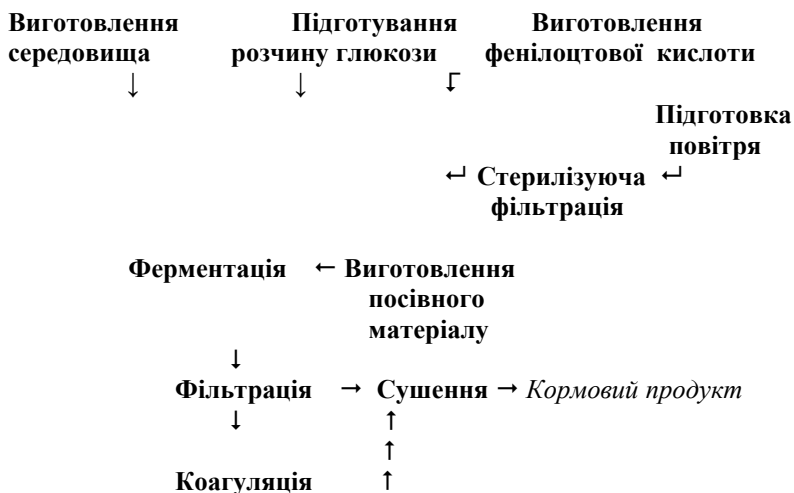


де, КР – культуральна рідина;  
ВКР – відпрацьована культуральна рідина.

*Виробництво пекарських дріжджів* є прикладом виготовлення живого біопрепарату. При сушенні необхідна порівняно низька температура, для того щоб клітини зберегли життєздатність. Стоки з процесу в цикл не повертаються, а надходять на очищення.



*Виробництво пеніциліну* має дуже тривалу технологічну схему, за якої багато підготовчих стадій, стадій забезпечення чистоти продукції.









**4. Екологічні аспекти біотехнологічного виробництва.** Сучасне біотехнологічне виробництво є більш екологічним, ніж хімічне виробництво тому, що:

- в основі його міститься використання біологічних об'єктів, що є збалансованим комплексом біокаталізаторів;
- значно менше витрачають води;
- менш енергоємні;
- мають менше виробничих відходів.

Але й біотехнологічне виробництво має необхідність покращення, а саме:

- одержання та використання більш активних, іммобілізованих біооб'єктів-продуцентів;
- мембранних технологій на стадії виділення та очищення цільового продукту;
- менш дефіцитних середовищ та реагентів.

Екологічні проблеми біотехнологічних виробництв, насамперед, полягають в утилізації або очищенні виробничих відходів твердих, рідинних та газоподібних тощо.

До твердих відходів належить, насамперед, біомаса продуцента, яка відокремлена від культуральної рідини та цільового продукту, представленого біологічно активною речовиною. Обсяг цих відходів з одного підприємства досягає сотні тонн на рік.

На сучасних виробництвах такі відходи змішують з ґрунтом і закладають на кілька років у закриті ями з бетонними стінками та підложками, для ферментативного розщеплення з утворенням компосту. Ці ями, зазвичай, розташовують на території виробництва.

Можливе додаткове використання відходів біомаси. Наприклад, певні відходи біомаси після стерилізації додають до корму тваринам. Відходи виробництва антибіотиків можна застосовувати для підвищення якості керамзиту та цегли. Але ці процеси в більшості тільки розробляються й малоекономічні.

Рідинні відходи являють собою культуральну рідину після відділення від неї біомаси та цільового продукту. Обсяг цих стоків для одного виробництва досягає кількох десятків

тисяч кубометрів. Метою очищення є можливість зливання її у відкриті водоймища. Залежно від природи забруднювальних речовин схема біологічного очищення може змінюватися.

Основою майже всіх систем такого очищення є біологічне очищення з використанням активного мулу. Активний мул становить собою біоценоз багатьох мікроорганізмів, які мають комплекс ферментів для здійснення окиснення різних речовин. Видовий склад мікроорганізмів активного мулу різниться залежно від хімічного складу відходів. Таке очищення містить:

- відстоювання культуральної рідини з виділенням забруднюючої речовини у вигляді осаду (до 40% від початкової кількості);

- окиснення речовин рідини до  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2\text{O}$  в одному або кількох послідовно розміщених аеротенках за умов постійного збовтування пухирцями повітря (до 50% від початкової кількості);

- окислення важкоокислювальних речовин за допомогою біофільтрів, які утворені іммобілізованими клітинами мікроорганізмів (до 10% від початкового вмісту).

Очищена вода за необхідністю хлорується та надходить до водоймища.

Газові відходи очищуються у спеціальних колонках з неорганічними каталізаторами при температурі від 300 до 1000 °С, при цьому утворюється  $\text{CO}_2$ . Іноді використовують біологічні фільтри на основі мікроорганізмів з високими окиснювальними можливостями.

### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Дайте визначення поняття „біотехнологічний процес”.
2. Схарактеризуйте скорочені технологічні процеси, фактори, які їх визначають.
3. Дайте визначення поняття „біотехнологічна стадія”, Схарактеризуйте її сутність.
4. Перерахуйте та схарактеризуйте біотехнологічні процеси, що можуть належати до складу біотехнологічної стадії.
5. Охарактеризуйте призначення та можливі варіанти

здійснення підготовчої стадії, розділення рідини й біомаси, виділення продуктів біосинтезу, очищення продукту, концентрування продукту, виготовлення готової форми продукту.

6. Складіть блок-схему виробництва кормового лізину.
7. Складіть блок-схему виробництва йогурту.
8. Що являють собою відходи біотехнологічного виробництва?
9. Які існують методи очищення газоподібних відходів біотехнологічних виробництв?
10. У чому полягає очищення твердих відходів біотехнологічних виробництв?
11. У чому може полягати загальне покращення біотехнологічних виробництв?

#### **Література:**

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988 . – 479 с.
2. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолоС, 2004. – 296 с.
3. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.
4. Сазыкин Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Изд. центр „Академия”, 2007. – 256 с.

### **Тема № 3: ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ТА ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ**

**Мета:** вивчити поняття екологічна біотехнологія, визначити основні її напрями. Схарактеризувати основні напрями використання біотехнологічних процесів для вирішення проблем екологічного характеру та харчової промисловості. Дати характеристику перспектив розвитку цих напрямів.

**1. Екологічна біотехнологія та її завдання. Біотрансформація ксенобіотиків та речовин, що забруднюють навколишнє середовище.**

**2. Отримання екологічно чистої енергії.**

**3. Очищення стічних вод.**

**4. Біотехнологічні процеси в харчовій промисловості.**

**1. Екологічна біотехнологія та її завдання. Біотрансформація ксенобіотиків та речовин, що забруднюють навколишнє середовище.**

**1.1. Сутність екологічної біотехнології.** Екологічна біотехнологія – це новітній підхід до охорони та збереження навколишнього середовища при спільному використанні досягнень біохімії, мікробіології, генетичної інженерії та хімічних технологій.

Екобіотехнологія вирішує широке коло проблем – від розробки й удосконалення методології комплексного хіміко-біологічного дослідження екосистем поблизу джерел техногенних дій до розробки технологій та рекомендацій щодо рекультивациі ґрунту, біологічного очищення води й повітря, біосинтезу препаратів, компенсуючи шкідливий вплив зміни навколишнього середовища на людей і тварин.

У процесі кругообігу забруднюючих речовин в екосистемах величезну роль відіграють мікроорганізми. Крім

використання діяльності мікроорганізмів у харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості й у генній інженерії з'явилася можливість їх застосування для переробки відходів життєдіяльності людини.

У зв'язку зі зростанням міст і розвитком промисловості виникли серйозні екологічні проблеми: забруднення водоймищ, накопичення отруйних речовин, зокрема канцерогенних, побутового сміття і відходів, забруднення повітря.

Проте, багато високомолекулярних полімерів та низькомолекулярних сполук, отрутохімікатів, детергентів, створених людиною, дуже стійкі та не розкладаються мікроорганізмами, тобто потрібна розробка вдосконалених технологій.

Зазвичай для утилізації відходів застосовують комплекси мікроорганізмів і спеціальні приладові пристрої. Багато зі створених людиною хімічних речовин проявляють біологічну активність: володіють мутагенними, канцерогенними, тератогенними властивостями, порушують структуру клітини. До речовин, що характеризують як канцерогени та мутагени належить ДДТ, поліхлорпірен, цирам, ТМТД, беноміл, пиримор, хлорофос, дихлофос, каптан тощо. Резистентність у шкідників, патогенів та бур'янів викликають ДДТ, токсифен, малатіон, хлорофос, мідний купорос, талан, фітон. Такі речовини як меркаптофос, диметеоат стимулюють розмноження шкідників.

Багато речовин, що забруднюють біосферу, за своїм походженням є природними сполуками. Наприклад, компонент деревини лігнін, що утворюється в значних кількостях як відхід целюлозно-паперової промисловості, – небезпечний поллютант. До речовин природного походження, що забруднюють біосферу, належить і багато ароматичних і галоген уміщуючих вуглеводів.

**1.2. Біотрансформація ксенобіотиків та речовин, що забруднюють навколишнє середовище.** Чужорідні речовини (ксенобіотики), потрапляючи до організму людини та тварин, зазнають різної біотрансформації: окислення, відновлення, гідролізу, кон'югації та інших процеси за участі ферментних систем.

Так, у реакціях окислення чужорідних речовин особливе

місце посідають мікросомальні монооксигенази, а також комплекси мембранно-пов'язаних ферментів за участю цитохромів Р-450. Біотрансформація чужорідних речовин під впливом мікроорганізмів і ферментів здійснюється у воді та ґрунтах. Вивченню цих реакцій у ґрунтах заважає гетерогенність середовища й адсорбція ксенобіотиків, мікроорганізмів і ферментів на частинках та колоїдах ґрунтів. Стійкість багатьох ксенобіотиків у біосфері досить висока. Наприклад, ДДТ не зникає з ґрунту до 30 років; альдрин і хлордан – до 15 років; діельдрин – до 25 років; гептахлор – до 14 років. Окремі полютанти можуть утворювати стійкі або токсичні продукти при розпаді та трансформації.

Серед ксенобіотиків, що вносяться людиною в біосферу, чимала частина належить до похідних нафталіну й саліцилової кислоти. У перетворенні цих з'єднань бере участь велика кількість ферментів.

**2. Отримання екологічно чистої енергії.** Екологічно чисту енергію можна отримувати шляхом перетворення сонячної енергії на електричну за допомогою сонячних колекторів, а також з біогазу й мікробного етанолу.

**2.1. Біогаз.** Біогаз – це суміш з 65% метану, 30% вуглекислого газу, 1% сірководню і незначних домішок азоту, кисню, водню і чадного газу. Енергія, зв'язана, в 28 м<sup>3</sup> біогазу, еквівалентна такій енергії: 16,8 м<sup>3</sup> природного газу; 20,8 л нафти; 18,4 л дизельного палива. В основі отримання біогазу міститься процес метанового бродіння або біометаногенез – процес перетворення біомаси на енергію.

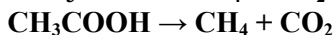
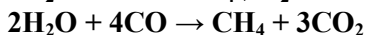
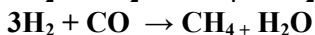
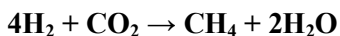
Біометаногенез – складний мікробіологічний процес, у якому органічна речовина розкладається до діоксиду вуглецю і метану в аеробних умовах. Мікробіологічному анаеробному розкладанню піддаються практично всі з'єднання природного походження, а також значна частина ксенобіотиків органічної природи. В анаеробному процесі біометаногенезу виділяють три послідовні стадії, у яких беруть участь понад 190 різних мікроорганізмів.

На першій стадії під впливом екстрацелюлярних

ферментів ферментативному гідролізу піддаються складні багатовуглецеві з'єднання – білки, ліпіди й полісахариди. Разом з гідролітичними бактеріями функціонують і мікроорганізми – бродильники, які ферментують моносахариди, органічні кислоти.

На другій стадії (ацидогенез) у процесі ферментації беруть участь дві групи мікроорганізмів: ацетогенні та гомоацетатні. Ацетогенні  $H_2$ -продукуючі мікроорганізми ферментують моносахариди, спирти й органічні кислоти з утворенням  $H_2$ ,  $CO_2$  нижчих жирних кислот, в основному ацетату, спиртів та деяких інших низькомолекулярних сполук. Деградація бутирату, пропіонату, лактату з утворенням ацетату здійснюється при спільній дії ацетогенних  $H_2$ -продукуючих і  $H_2$ -утилізуючих бактерій. Гомоацетатні мікроорганізми засвоюють  $H_2$  та  $CO_2$ , а також окремі одновуглецеві сполуки через стадію утворення ацетил-КоА і перетворення його в низькомолекулярні кислоти, в основному в ацетат.

На завершальній третій стадії анаеробного розкладання відходів утворюється метан. Він може синтезуватися через стадію відновлення  $CO_2$  молекулярним воднем, а також з метильної групи ацетату. Окремі метанові бактерії здатні використовувати як субстрат форміат,  $CO_2$ , метанол, метиламін й ароматичні сполуки:



Особливе місце в утилізації відходів займає метанове бродіння. Воно дозволяє отримувати з місцевої сировини біогаз як локальне джерело енергії, а також покращує якість органічного добрива й можливість захищати навколишнє середовище від забруднень.

У середньому 90% використаного вуглецю



метаноутворюючі бактерії перетворюють на метан і лише 5–10% вуглецю перетворюється на біомасу. Залежно від температури протікання процесу метанові бактерії розділяють на мезо- і термофільні. Оптимальна температура для мезофільних бактерій становить від 30 до 40°C, а для термофільних – від 50 до 60°C. У цілому термофільний процес метаногенезу здійснюється інтенсивніше, ніж мезофільний, крім того субстрат знезаражується від патогенної мікрофлори та гельмінтів. При анаеробній переробці відходів тваринницьких ферм мікрофлора метантеків (анаеробних ферментерів) формується переважно з мікрофлори шлунково-кишкового тракту цього виду тварин і мікрофлори навколишнього середовища. Після певного терміну роботи метантенка при встановленому температурному режимі та постійному субстраті утворюється порівняно стабільний консорціум мікроорганізмів. У ході вивчення мікрофлори свинячого навозу при метановому бродинні виділено близько 130 різних бактерій.

Для отримання біогазу можна використовувати відходи сільського господарства, зіпсовані продукти, стоки крохмалепереробних підприємств, рідкі відходи цукрових заводів, побутові відходи, стічні води міст і спиртних заводів. Процес здійснюється при температурі 30–60°C та рН 6–8. Цей спосіб отримання біогазу широко застосовують в Індії, Китаї, Японії.

У наш час для виробництва біогазу частіше використовують вторинні відходи (відходи тваринництва і стічні води міст). Подача відходів (субстрата) і відбір відпрацьованого стоку здійснюються в нижній частині реактора. Режим його роботи може бути як періодичним, так і напівбезперервним. Реактор зазвичай має дві (або більш) секції для розділення стадій процесу.

Сучасний стан проблем і перспектив у галузі отримання біогазу свідчить про те, що анаеробна конверсія органічних відходів у метан – найбільш конкурентоздатна галузь біоенергетики. Основна перевага біогазу полягає в тому, що він є поновлюваним джерелом енергії. Його виробництво буде таким же тривалим, як існування життя на Землі.

**2.2. Виробництво етанолу.** Енергію можна отримувати з рослин, багатих вуглеводами, перетворюючи їх на спирт (етанол). До них належать меласа, картопля, маніок, стебла кукурудзи, злаки, топінамбур (земляна груша). Велику кількість етанолу отримують з гідролізату деревини листяних порід або з сульфатних лугів – відходів паперових фабрик. Отриманий спирт можна змішувати з бензином у співвідношенні 1:9 (або навіть 1:4) і заправляти ним машини.

Зростання виробництва етанолу пов'язане з широтою його застосування в хімічній промисловості. Він прекрасний розчинник, антифриз, екстрагент. Етанол слугує також субстратом для синтезу багатьох розчинників, барвників, лікарських препаратів, змашувальних матеріалів, клеїв, миючих засобів, пластифікаторів, вибухових речовин і смол для виробництва синтетичних волокон. Його використовують у двигунах внутрішнього згорання чи в безводному вигляді, або у формі гідратованого етанолу. Серед рослин – джерел етилового спирту, слід виділити маніок, злаки (особливо кукурудзу) і топінамбур, у якого запасним вуглеводом є інулін. Використовуються також цукровий очерет, ананас, цукровий буряк, сорго, у яких основний вуглевод – сахароза.

При переробці цукрового очерету його ретельно тиснуть, целюлозу (жом) відокремлюють від солодкого соку і спалюють, а сік концентрують, стерилізують і піддають бродінню. Цей розчин відокремлюють від твердих компонентів і далі з 8–10% спиртного розчину шляхом перегонки отримують етанол. З рідини (стилаж), що залишилася, після відповідної переробки витягують компоненти добрив з виходом 2–3%. „Барду” (залишок) після перегонки використовують як корм для сільськогосподарських тварин.

Прекрасною сировиною для отримання етанолу є маніок, здатний рости в напівпустинних районах; він може використовуватися цілорічно. З 1 т маніока вдається отримати 80 л етанолу, а з 1 т цукрового очерету – 60–65 л.

У США широко застосовують суміш з 6–9 г бензину і 1 г етанолу (газохол). У 28 штатах нею заправляють близько 800

станцій, але для заміни всього бензину, споживаного у США, газохолом потрібно буде щорічно проводити 45,6 млрд л етанолу, що значно перевищує вироблювану кількість спирту, зокрема із злаків.

У Франції вперше здійснено заміну 10% чистого бензину сумішшю метанолу й ацетонобутанолу, який одержують при переробці надземних залишків топінамбура та інших інсулінуміщуючих субстратів.

**2.3. Перетворення сонячної енергії.** Резерви сонячної енергії достатньо великі: на поверхню земної кулі потрапляє близько 5 10<sup>20</sup> ккал цієї енергії за рік, що в 10 000 разів перевищує сучасний рівень світової енергетики за рахунок палива корисних копалин. Сонячна енергія здатна забезпечити сучасний і майбутній рівень енерговитрат людства. Кількість енергії, що падає на загальну площу пустель на Землі (2–107 км<sup>2</sup>), досягає 1018 кВт·ч. Якщо засвоїти цю енергію з ККД, близьким до 5%, то рівень світової енергетики зросте більш ніж у 200 разів. Здійснюються дослідження у напрямі освоєння сонячної енергії, яка падає на поверхню морей та океанів.

Найбільш перспективний метод великомасштабного перетворення сонячної енергії заснований на використанні біосистем. Широке застосування біосистем для отримання енергії здатне забезпечити понад 15% виробництва енергії для економічно розвинених країн. В останні 10–15 років з'явилися нові шляхи біотрансформації сонячної енергії при фотосинтезі. Установлено, що окремі мікробіологічні системи характеризуються високою ефективністю фотосинтезу. Так, фотоліз води, який здійснює суспензія хлорели з утворенням кисню, в оптимальних умовах культивування дає 130–140 л газу з 1 м<sup>2</sup> опромінюваної поверхні за добу. Відомо, що одна з особливостей процесу фотосинтезу – зменшення ефективності перетворення сонячної енергії при високих значеннях інтенсивності світла. Нові технології дозволяють підвищити ефективність фотосинтезу при високій інтенсивності світла. Розробляються системи, що ефективно поглинають світловий потік і збагачені реакційними центрами стосовно до пігменту. Світлові криві фотосинтезу поліпшуються також із збільшенням

швидкості лімітуючої стадії електронного транспорту. Наприклад, проведення процесу при підвищених температурах у системах термофільних мікроорганізмів збільшує ефективність перетворення сонячної енергії при високій інтенсивності світла.

**2.4. Фотовиробництво водню.** Відомо, що хлоропласти (наприклад, з шпинату) за наявності штучного донора електронів і бактерійного екстракту, що містить фермент гідрогеназу, здатні продукувати водень:

**Донор електронів → фотосистема I → переносник електронів → гідрогеназа →  $H_2$  ↑**

Гідрогеназа отримує електрони від ферредоксину. Як донори електронів використовують різні органічні сполуки. Процес супроводжується опромінюванням видимим світлом. Ця форма отримання енергії має низку переваг: надлишок субстрату фотолізу (води); нелімітоване джерело енергії (сонячне світло); водень, що не забруднює атмосферу. Водень має більш високу теплотворну здатність порівняно з вуглеводами. Крім того, процес отримання водню – поновлюваний процес. Водень можна отримувати за участю поглинаючих світло пігментів, а не мембран хлоропластів. Його здатні виділяти й окремі мікроорганізми, наприклад, ціанобактерії (аеробні фототрофи) та ін.

Основна проблема створення систем конверсії енергії біомаси у водень пов'язана з перетворенням цих метаболітів на паливну форму.

Є попити вбудувати молекули пігментів у штучні системи й підвищити ефективність їх використання.

**3. Очищення стічних вод.** Найважливіша проблема екологічної біотехнології – очищення стічних вод. На сучасному етапі виділяються такі напрями раціональної витрати водних ресурсів: повніше використання і розширення відтворення ресурсів прісних вод; розробка нових біотехнологічних процесів, які дозволяють запобігти забрудненню водоймищ.

Основні джерела забруднення та засмічення водоймищ –

недостатньо очищені стічні води промислових і комунальних підприємств, крупних тваринницьких комплексів, відходи виробництва при розробці рудних копалин (води шахт, копалень); скидання водного й залізничного транспорту; пестициди тощо.

Основні методи очищення стічних вод: механічні, хімічні, фізико-хімічні й біологічні. Застосування того або іншого методу в кожному конкретному випадку визначається характером і ступенем шкідливості домішок.

1. Механічні методи. Ці методи містять відстоювання та фільтрацію з метою видалення механічних домішок. Грубодисперсні частинки залежно від розмірів затримуються на ситах, пісколовках, гнієловках, нафтопастках і т. д. Механічне очищення забезпечує видалення з побутових стічних вод до 60–75% нерозчинних домішок, а з промислових – до 95%, багато з яких як цінні домішки використовуються у виробництві.

2. Хімічний метод. До стічних вод додають різні хімічні реагенти, які вступають в реакцію із забруднювачами й осаджують їх у вигляді нерозчинних опадів. Хімічне очищення зменшує кількість нерозчинних домішок до 95%, а розчинних – до 25%.

3. Фізико-хімічні методи використовують для видалення тонкодисперсних і розчинених неорганічних домішок, а також руйнування органічних і погано окислюваних речовин.

До цих методів належить електроліз, окислення, сорбція, екстракція, іонообмінна хроматографія, ультразвук, високий тиск та ін.

4. Біологічний метод заснований на використанні закономірностей біохімічного і фізіологічного самоочищення річок та інших водоймищ. Для очищення стічних вод використовують біофільтри, біологічні ставки й аеротенки.

У біофільтрах стічні води пропускають через шар крупнозернистого матеріалу, покритого тонкою бактерійною плівкою, завдяки якій інтенсивно здійснюються процеси біологічного окислення. У біологічних ставках в очищенні стічних вод беруть участь усі організми, що населяють водоймище.

Аеротенки – величезні резервуари із залізобетону, у яких очищення здійснюється за допомогою активного мулу з бактерій і мікроскопічних тварин, які бурхливо розвиваються в цих спорудах, чому сприяють органічні речовини стічних вод і надлишок кисню, що надходить з потоком повітря, що подається. Бактерії, що склеюються у пластівці, виділяють у середовище ферменти, що руйнують органічні забруднення. Мул з пластівцями осідає, відділяючись від очищеної води. Інфузорії, жгутикові, амеби, коловертки та інші найдрібніші тварини, пожираючи бактерії, що не злиплися у пластівці, таким чином омолоджують бактерійну масу мулу. Стічні води спочатку піддають механічному, а після хімічному очищенню для видалення хвороботворних бактерій шляхом хлорування рідким хлором або хлорним вапном. Для дезинфекції використовують також ультразвук, озонування, електроліз та інші методи.

Біологічний метод дає істотні результати при очищенні комунально-побутових стоків, а також відходів підприємств нафтопереробної, целюлозно-паперової промисловості та виробництва штучного волокна. Проте він руйнує тільки порівняно прості органічні амонійні сполуки.

Відстій стічних вод і його використання. Залежно від ступеня обробки відстій міських стічних вод зазвичай поділяють на:

- первинний (необроблений), такий, що складається з твердих речовин;
- вторинний – тверді речовини, що виділяються після вторинного відстою, або відстій з біофільтрів очисних споруд;
- третинний – результат третинного відстою стічних вод (вапно та глина);
- відстій, що перегнив у анаеробних умовах.

До осушення відстій містить велику кількість вологи (до 95 %). Після певної стабілізації відстою, яка досягається шляхом його зброджування, вміст твердих речовин становить 30%.

При очищенні стічних вод застосовують і метанове бродіння, яке здійснюється в реакторах (метантенках) в основному двох типів: у реакторах без фіксації біомаси й у

реакторах з прикріпленою (фіксованою) біомасою. Як підкладку, до якої прикріпляється біомаса, використовують дрібний пісок, окис алюмінію та інші носії.

#### **4. Біотехнологічні процеси в харчовій промисловості.**

До найважливіших напрямів біотехнології належать певні галузі харчової промисловості. Сьогодні біотехнологія не лише вдосконалює традиційні методи, які широко використовують у харчовій промисловості при виробництві молочнокислих продуктів, сиру, харчових кислот, алкогольних напоїв, але і створює сучасні технології для синтезу полімерів, штучних приправ тощо.

**4.1. Виробництво кормового білка.** Відповідно до норм живлення людина та тварини повинні щодня отримувати з їжею 60–120 г повноцінного білка. Окремі амінокислоти, що мають назву незамінних, людина і тварини не можуть синтезувати. Ці амінокислоти надходять до організму з їжею, їх відсутність викликає важкі захворювання людини і зниження продуктивності сільськогосподарських тварин. Головними джерелами незамінних амінокислот є білки тваринного й рослинного походження, що належать до складу їжі, а для тварин – в основному рослинні білки.

Якщо вміст білків у рослинному кормі нижчий за норму, то кількість білка в кормі компенсують уведенням білкових добавок у вигляді препаратів незамінних амінокислот або білкової маси з вищим вмістом амінокислот.

Особливий інтерес становить використання мікроорганізмів як джерела білка і вітамінів під час виробництва харчових продуктів. Харчові продукти, що отримують з додаванням мікробних препаратів, повинні пройти всебічну перевірку для виявлення канцерогенної, мутагенної дії на організм людини та тварин. Як джерела кормового білка частіше використовують різні види дріжджів і бактерій, мікроскопічні гриби, одноклітинні водорості, білкові коагуляти трав'янистих рослин.

**4.2. Використання дріжджів і бактерій.** Дріжджові клітини як джерело вуглецю здатні використовувати нерозгалужені вуглеводи з числом від 10 до 30 вуглецевих

атомів у молекулі. Такі вуглеводи формують рідкі фракції вуглеводів нафти. У нашій країні з n-парафінів нафти виробляють понад 1 млн т кормових дріжджів. При вирощуванні дріжджів на n-парафінах нафти у приготовлене з них живильне середовище додають макро- і мікроелементи, необхідні вітаміни й амінокислоти. Висушену дріжджову масу гранулюють і використовують як білково-вітамінний концентрат (БВК), що містить до 50–60% білкових речовин, для годування сільськогосподарських тварин.

Гарним субстратом для вирощування кормових дріжджів є молочна сироватка – виробничий відхід переробки молока. У 1 т молочної сироватки міститься близько 10 кг білка і 50 кг лактози. Ці білки використовують для приготування сухого знежиреного молока. Рідкі відходи, що залишаються після відділення білків (пермеат), переробляють культивуванням дріжджів у збагачені білками кормові продукти.

Як джерело вуглецю дріжджові клітини можуть використовувати і нижчі спирти, а саме: метанол і етанол, що отримують з природного газу або рослинних відходів. Дріжджова маса, яка отримана після культивування дріжджів на спиртах, містить більше білків і менше шкідливих домішок, ніж кормові дріжджі, вирощені на n-парафінах нафти.

Розроблено технології отримання з дріжджів харчових білків. Так, пивні й харчові дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborescens*) широко використовують як білкові добавки до різних харчових продуктів. Розроблено рецептуру приготування сосисок з м'яса індички з додаванням 25% білка, дріжджового хліба й локшини з частковою заміною муки (США). У результаті ферментації дріжджовими клітинами глюкози, яку одержують з кукурудзяного крохмалю, синтезований білковий продукт мукопротеїн використовують при виробництві ковбас як заміник основної сировини (Великобританія).

Дуже корисними продуктами є ацидофільно-дріжджове молоко й сир, зроблені з нього. Технологія отримання сиру містить такі етапи. У цілісне молоко з 2% цукру вносять 3% добової культури дріжджів і витримують 4–7 год. при температурі 32–33°C. Отриману закваску додають в молоко і



витримують до згортання при температурі 33 °С ще 5–6 год. Такий сир багатий вітамінами В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub> та ін.

Важливим резервом харчового білка і вітамінів є залишки пивних дріжджів *Saccharomyces carlsbergensis*. Вони можуть з успіхом застосовуватися при виробництві ковбас як замітник казеїну, підвищувати біологічну і вітамінну цінність ковбас, покращувати їх смак, аромат та інші показники. Пивні дріжджі застосовують у харчовій промисловості для „ароматизації” м’яса, сиру та виробів з них. Біомасу дріжджів при переробці в харчовий білок ретельно очищують:

- спочатку руйнують стінки дріжджових кліток шляхом механічної, лужної, кислотної або ферментативної обробки з подальшою екстракцією гомогенної дріжджової маси відповідним органічним розчинником;

- потім дріжджовий продукт обробляють лужним розчином для розчинення білків;

- далі білковий розчин, відокремлений центрифугуванням від маси, дріжджів, піддають діалізу;

- очищені білки висушують і використовують як білкові добавки до різних харчових продуктів.

Відомо більше 30 видів бактерій, які можуть бути застосовані як джерела повноцінного кормового білка. Бактерії значно швидше, ніж дріжджові клітини, нарощують біомасу й мають більше цистеїну і метіоніну. Джерелом вуглецю при культивуванні бактерій можуть слугувати природний і супутні гази, водень, спирти. Виробництво кормового білка з газоподібних продуктів досить складне й дороге, частіше вирощують бактерії на метанолі, який легко отримують шляхом окислення метану. При культивуванні на живильному середовищі з метанолом найчастіше використовують бактерії *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus* й одержують білки прутін, мепрін (комерційні назви). Сьогодні розробляється технологія отримання кормового білка з етанолу на основі культивування бактерій роду *Acinetobacter* (препарат еприн).

Кормовий білок бактерійного походження додають до комбікорму в кількості 2,5–7,5% від білка раціону сільськогосподарських тварин, а при годуванні дорослих

свиной – до 15%.

#### **4.3. Використання водоростей і мікроскопічних грибів.**

Для отримання кормового білка використовують одноклітинні водорості *Chlorella* і *Scenedesmus*, синьо-зелені водорості з роду *Spirulina*, які здатні синтезувати білки з діоксиду вуглецю, води й мінеральних речовин за рахунок енергії сонячного світла. Водорості для свого розвитку потребують певних режимів освітлення й температури й великої кількості води. Зазвичай їх вирощують у природних умовах південних регіонів у басейнах відкритого типу. При вирощуванні водоростей у культиваторах відкритого типу з 1 га водної поверхні можна отримувати до 70 т сухої біомаси за рік.

Білкова маса з клітин водоростей надходить у виробництво у вигляді суспензії, сухого порошку або пастоподібного препарату.

Джерелом вуглецю для промислового вирощування мікроскопічних грибів слугують рослинні відходи, що містять клітковину, геміцелюлозу, лігнін, а також торф і гній. Зразки ковбас, вироблені із застосуванням мікроскопічних грибів, характеризуються високим ступенем переварюваності білкових речовин *in vitro* за рахунок активного пепсину і трипсину. Гриб *Penicillium roqueforti* широко використовується під час виробництва сирів, зокрема сиру рокфор. У Великобританії створено харчовий продукт, основним компонентом якого є білок грибною походження (*Fusarium graminearum*). Це мікопротеїн, який одержують на дешевому глюкозному сиропі, отриманому шляхом гідролізу пшеничного або кукурудзяного крохмалю. Мікопротеїн – це аналог м'яса, але порівняно з білками тваринного походження має кращу якість за вмістом білка, мінеральних речовин, вітамінів і ліпідів.

Для більш повного використання сировини практикується спільне культивування грибів і бактерій.

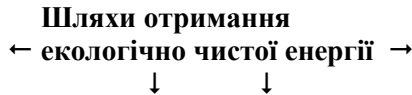
#### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Схарактеризуйте коло проблем екологічної біотехнології.

2. Наведіть можливі варіанти біотрансформації ксенобіотиків.

3. До похідних яких речовин належать найбільш поширені ксенобіотики, що потрапляють у навколишнє середовище внаслідок діяльності людини.

4. Виділіть можливі шляхи отримання екологічно чистої енергії й заповніть схему:



5. Схарактеризуйте сутність процесу фотовиробництва водню. У чому полягає основна проблема створення систем конверсії енергії біомаси у водень? Поясніть запропоновану схему:

**Донор електронів → фотосистема I → переносник електронів → гідрогеназа →  $H_2$  ↑**

6. Схарактеризуйте сутність процесу біометаногенезу, його стадії. За результатами заповніть таблицю „Характеристика біометаногенезу” (див. табл. 2.1).

*Таблиця 2.1*

**Характеристика біометаногенезу**

Назва стадії	Мікроорганізми, які беруть участь	Вихідні речовини	Сутність перетворення	Результат перетворення

7. Вкажіть перспективні напрями розвитку та межі використання біотехнології у харчовому виробництві. За результатами вивчення заповніть таблицю „Перспективи використання продукції біотехнології в харчовому виробництві” (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

**Перспективи використання продукції біотехнології в харчовому виробництві**

Продукт	Галузь використання
<i>Амінокислоти</i> – глутамат – цистеїн – гліцин	
<i>Олігопептиди</i> – аспартам, тауматин	
<i>Ферменти</i> – амілаза – інвертаза – ліпази	
<i>Вітаміни</i> – А, В <sub>1</sub> , В <sub>6</sub> , В <sub>12</sub> , С – С, Е	
<i>Терпени</i> – гераніол, нерол	
<i>Органічні кислоти</i> – оцтова, молочна, бензойна, лимонна	

8. Схарактеризуйте біотехнологічні процеси використання бактерій, дріжджів, мікроскопічних грибів в окремих процесах харчової промисловості за схемою: сировина, культура мікроорганізмів (закваска), значення мікроорганізмів закваски, умови процесу, характеристика продукту.

**Література:**

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988 . – 479 с.
2. Голубев В. И. Пищевая биотехнология / В. И. Голубев, И. Н. Жиганов. – М. : ДеЛи принт, 2001. – 264 с.
3. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.

## Тема № 4: БІОІНДУСТРІЯ ФЕРМЕНТІВ

**Мета:** визначити основні джерела ферментів та можливі шляхи їх використання. Схарактеризувати технологічні етапи одержання ферментних препаратів із різних джерел. Вивчити поняття інженерна ензимологія, дати характеристику процесу та методів іммобілізації ферментів, клітинних структур та клітин. Схарактеризувати великомасштабні виробничі процеси з використанням іммобілізованих ферментів та клітин.

- 1. Використання та джерела ферментів.**
- 2. Технологія одержання ферментних препаратів.**
- 3. Інженерна ензимологія.**

**1. Використання та джерела ферментів.** Ферменти – це біологічні каталізатори, які характеризуються не токсичністю, працюють у м'яких умовах, здатні зберігати свої властивості поза клітиною. Унаслідок цих властивостей їх використання у виробництві вигідне як з економічної, так і з екологічного боку.

За обсягом виробництва ферменти займають третє місце після антибіотиків та амінокислот. З відкритих на теперішній час більше 2000 ферментів у промисловості використовують кілька сотень. За кількістю ферментів, що надходять на ринок – 60% складають пептидогідролази та 30% – глікозидази.

Різні ферменти використовують у різних галузях:

– амілази (виділяють бактерії, гриби *Ballus sp*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*) використовують при гідролізі крохмалю до декстринів, мальтози, глюкози у спиртовій, пивоваренній промисловості, хлібопеченні, одержанні патоки, глюкози;

– глюкоізомерази (виділяють більш ніж 80 видів мікроорганізмів – *Bacillus sp.*, *Streptomyces allus*, *S. griseus*) використовують при ізомеризації D-глюкози в D-фруктозу в кондитерській, лікєро-горілчаній, безалкогольній промисловості, хлібопеченні;

– пептидогідролази (виділяють багато мікроорганізмів – *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* та інші) використовують для лізису білка при одержанні амінокислот, виробництві сиру, пом'якшенні м'ясних та рибних виробів, виробництві шкіри, виноробстві, пивоварінні, хлібпеченні та ін.

– глюкооксидази (виділяють *Penicillium chrysogenum*, *P. casei*, *P. nigricans*, *Aspergillus niger* та ін.) – використовують при видаленні кисню та глюкози з яйцевого порошку, м'ясних та інших виробів; у пивоварінні, безалкогольному виробництвах;

– ліпази (виділяють підшлункові залози тварин, насіння рослин, мікроорганізми *Candida lipolytica*, *Streptomyces flavogriseus*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces lipolytica*) – використовують при гідролізі жирів та масел у харчовому, легкому виробництві, медицині, сільському господарстві, комунальному господарстві.

Крім того, використовують пектинази, целулази, фруктофуранозидази та інші ферменти.

Велике значення мають ферменти, що каталізують реакції органічного синтезу, деградації речовин антропогенного забруднення, у медицині (для зниження вмісту різних речовин при ензимотерапії; в ензимодіагностиці, при тестуванні патології за рівнем активності ферментів).

За обсягом виробництва ферментів домінує Західна Європа, підвищення спостерігається у США та Японії.

Ферменти притаманні всім живим організмам, але для їх виділення використовують об'єкти з вмістом необхідного ензиму не менш 1 %.

Для крупномасштабного виробництва використовують:

– певні рослинні організми на визначеній фазі їх розвитку (проросле насіння, латекс, сік зеленої маси);

– окремі тканини та органи тварин (підшлункова залоза, слизова оболонка ЖКТ, сім'яники статевозрілих тварин);

– мікроорганізми (бактерії, гриби, дріжджі).

## **2. Технологія одержання ферментних препаратів.**

**2.1. Технологія культивування мікроорганізмів – продуцентів ферментів.** Залежно від джерела технологія одержання ферментних препаратів має свої особливості. При одержанні ферментів з рослинної сировини та тканини тварин технологія зводиться до екстракції ензимів й очищення їх від баластних речовин. Технологія ферментних препаратів мікробного походження більш складна, тому що додатково вміщує етапи одержання посівного матеріалу та виробництва культури відповідного мікроорганізму.

Для виробництва посівного матеріалу використовують вихідний штам, який одержують з лабораторної чистої культури. Чисту культуру вирощують на стерильному поживному середовищі до визначеного віку, а потім консервують висушуванням або зберіганням при низьких температурах.

Існує кілька варіантів вирощування продуцента з посівного матеріалу:

– поверхневий метод – сутність цього методу полягає в культивуванні культури на поверхні поживного середовища. Інкубацію мікроорганізмів проводять у спеціальних термостатних цехах при постійному контролі температури, вологості, подачі повітря; як поживне середовище використовують зволожені стерилізовані висівки з додаванням солодових ростків, буякового жому та інших компонентів;

– глибинний метод – в останні роки вважають більш економічним, у виробничих умовах для цього використовують ферментери, які мають приладдя для перемішування та подачі стерильного повітря в рідке поживне середовище. Для запобігання інфікування у ферментері створюють підвищений тиск, сумісно з оптимальним рН, температурою, редокс-потенціалом та іншими умовами;

– проточний метод – цей метод вважають найбільш прогресивним; він забезпечує постійну подачу до ферментера як поживного середовища, так і посівного матеріалу; ферментер, де

здійснюється цей процес, має вигляд трубкаподібного реактора, крізь один кінець якого надходить поживне середовище та культура, а через інший – виводяться ферменти, продукти життєдіяльності та бактеріальна маса.

Важливим фактором ефективності технології ферментних препаратів є якість поживного середовища, тобто повноцінність її складу, яка забезпечує ріст продуцента та біосинтез цільового ферменту. Завдяки використанню відходів поживні середовища доступні, дешеві й забезпечують безвідходність біотехнологічних виробництв.

## **2.2 Виділення та очищення ферментних препаратів.**

Виділення та очищення ферменту як з культури мікроорганізмів, так і з інших природних джерел дуже енергоємна та дорога процедура. Тому, якщо можливо використовувати фермент у вигляді неочищеного препарату, то його не очищують. У виробництві широко використовують комерційні препарати ферментів з чистотою всього 0,1% (99,9% складають домішки). До таких галузей належать спиртова, текстильна, шкіряна промисловість, а також сільське господарство, виробництво побутової хімії. У більшості галузей харчової промисловості, медицини, науково-дослідної практики використовують частково або повністю очищені препарати ферментів. Похідним матеріалом для одержання препаратів ферментів слугує: біомаса продуцента, фільтрат культуральної рідини, екстракт з культури мікроорганізмів або з тканин та органів рослин та тварин.

Неочищені ферментні препарати одержують шляхом висушування в м'якому режимі культур мікроорганізмів, спільно з залишками поживного середовища. Такі препарати одержують і шляхом упарювання екстракту з культури продуцента, який виростили поверхневим способом або з фільтрату культуральної рідини, якщо мікроорганізм ріс за умов глибинного методу. Поширеним є також метод ацетонових порошків, сутність якого полягає в осадженні та швидкому зневодненні, при температурі  $-10^{\circ}\text{C}$ , тканин або витяжок з них, які вміщують ферменти.

Для видалення ферментів з клітинного вмісту



використовують спеціальні млини, гомогенізатори, ультразвук, а також поперединне заморожування та відтаювання тканини. При видаленні ферментів з мембранних структур клітини до гомогенатів додають невеликі кількості детергентів (твін, тритон X-100) або обробляють їх ензимами – лізоцимом, целюлазотом, лецитиназотом С. Усі операції видалення ферментів здійснюють в умовах, які виключають денатурацію білка.

Залежно від властивостей ферменту, який виділяють, та баластних речовин, при одержанні очищених препаратів ферментів комбінують різні прийоми та методи, такі як термічне фракціонування, осадження органічними розчинниками, солями та важкими металами, фільтрування на вічках, іонообмінну хроматографію, електрофорез, ізоелектрофокусировку.

На заключних етапах очищення часто використовують афінну хроматографію, яка заснована на здатності ферментів вибірково зв'язувати ті чи інші ліганди – субстрати, коферменти, конкурентні інгібітори, аллостеричні ефектори та інші.

У процесі виділення підвищується частка ферменту в масі тотальних білків, тобто підвищується його питома активність. Очищені препарати зберігають при низькій температурі (до  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Для стабілізації ферментів до препаратів додають коферменти та субстрати.

**3. Інженерна ензимологія.** Інженерна ензимологія займається розробкою прогресивних методів виділення ферментів, їх стабілізації, іммобілізації; будівництвом каталізаторів з необхідними властивостями та розробкою наукових основ їх використання.

Важливим етапом у розвитку інженерної ензимології є розробка способів одержання та використання іммобілізованих ферментів.

Сутність методів білкової інженерії полягає в зміні первинної структури природної молекули ферменту за допомогою хімічної модифікації самого ензиму або його гену.

**3.1. Іммобілізовані ферменти.** Іммобілізовані ферменти – це ферменти, штучно зв'язані з нерозчинними носіями, але які зберігають свої каталітичні властивості.

Сьогодні термін „імобілізації” – більш широке поняття, яке характеризує зв'язування з нерозчинним носієм та обмеження свободи руху білкової молекули. Переваги імобілізації ферментів, порівняно з вільними молекулами, полягають в тому, що вони:

- є гетерогенними каталізаторами, тобто легко відокремлюються від середовища, використовуються багаторазово, забезпечують непереривність каталітичного процесу;

- змінюють властивості ферменту – стійкість, субстрату специфічність, залежність активності від параметрів середовища;

- більш довговічні та стабільні;

- можуть використовуватися не очищеними, тому що забруднення затримується носіями (гелями, капсулами) і не потрапляє до цільового продукту.

Ідеальні матеріали, які використовують для імобілізації ферментів, повинні бути:

- нерозчинні;

- з високою хімічною та біологічною стійкістю;

- значно гідрофільні;

- з високою проникливістю для ферментів, субстратів, продуктів;

- легко активізуються.

Сьогодні жоден з носіїв, що використовуються, не має всіх корисних властивостей, але вони здатні працювати у визначених умовах.

Залежно від природи носії поділяються на органічні та неорганічні. Органічні носії можуть бути природними полімерними (білкові, полісахарідні, ліпідні) та синтетичними полімерними (поліамідні, поліефірні, поліметиленові).

До переваг природних носіїв належить їх доступність, поліфункціональність, гідрофільність; до недоліків – біодеградуваність, висока вартість. З полісахаридних носіїв використовують целюлозу, декстрин та інші, з білків – кератин, колаген.

Синтетичні носії характеризуються міцністю,

варіабельністю діаметрів пор, мають різні фізичні форми – волокна, гранули, труби. До них належать полімери на базі стиролу, акрилової кислоти, полівінілового спирту; поліамідних та поліуретанових полімерів.

Як носії неорганічної природи часто використовують матеріали зі скла, глини, кераміки, силікагелю, силіхромів, окисів металів. Ці носії можна піддавати хімічній модифікації. Вони легко регенерують та набувають необхідної форми, ступеня пористості.

Сьогодні створено багато різних носіїв для іммобілізації ферментів. Однак, для кожного індивідуального ферменту, у різних технологічних процесах, використовують оптимальні варіанти носіїв та умови, способи іммобілізації.

**3.2. Методи іммобілізації ферментів.** Існує два принципово різні методи іммобілізації ферментів: без виникнення ковалентних зв'язків між ферментом та носієм (фізичні методи іммобілізації) та з утворенням ковалентних зв'язків між ними (хімічні методи іммобілізації). Кожен з цих методів здійснюється різними способами.

Фізичні методи іммобілізації ферментів реалізуються завдяки адсорбції ферменту на нерозчинному носії, шляхом включення ензимів у пори гелю або в напівпроникні структури, двохфазні системи. До фізичних методів належить:

1. Адсорбція ферментів на нерозчинному носії, яка здійснюється за рахунок утримання молекули білка на носії електростатичними, гідрофільними, дисперсійними взаємодіями та водневими зв'язками. Це перший метод іммобілізації ферментів (Дж. Нельсон, Є. Гріффіс, 1916). Як носії в цьому методі використовують кремнезем, активоване вугілля, глину, пористе скло, полісахариди, окиси алюмінію, титану та ін. Нанесення ферментів здійснюється шляхом змішування та висушування в м'яких умовах (питома концентрація білка 64 мг на 1 г носія).

Недоліком цього методу є невелика міцність зв'язків, а перевагою – простота нанесення.

2. Іммобілізація шляхом включення в гель здійснюється введенням ферменту у водний розчин мономера, з подальшою

полімеризацією, або в готовий розчин полімеру. Завдяки цьому виникає просторова структура – молекули ферменту вбудовані в гель. Як носії використовують полікриламін, силікагель, крохмаль, агар-агар, агарози та інші. Більшість цих матриць має високу механічну, хімічну, теплову та біологічну стійкість та забезпечують багаторазове використання ферменту. Цей метод є неприйнятним для іммобілізації ферментів, що діють на водонепроникні субстрати.

3. Іммобілізація ферментів у напівпроникних структурах. Сутність цього методу полягає у відокремленні водного розчину субстрату за допомогою напівпроникної мембрани, що пропускає низькомолекулярні молекули субстратів, але затримує ферменти.

Існує кілька модифікацій методу:

1) мікрокапсулювання – полягає в тому, що водний розчин ферменту міститься в середину замкненої мікрокапсули, яка утворена напівпроникним полімером.

Перевагами цього методу є простота, універсальність, можливість іммобілізації комплексу ферментів. До недоліків належать неможливість таких ферментів здійснювати перетворення високомолекулярних сполук.

2) включення ферментів у ліпосоми, що покриті ліпідним бішаром та мають вигляд сферичних або ламінарних систем. Для одержання ліпосом з розчину ліпідів (найбільш часто лецитину) упарюють органічний розчинник. Далі тонку плівку ліпідів диспергують у водному розчині, який вміщує фермент. У процесі диспергування здійснюється самоутворення ліпосом, що вміщують розчин ферменту. Ферменти, іммобілізовані цим шляхом, часто використовують у медицині та наукових дослідженнях.

Інші методи іммобілізації за рахунок фізичних властивостей менш поширені.

Хімічні методи іммобілізації ферментів базуються на утворенні нових ковалентних зв'язків між ферментом та носієм і є найбільш масовим способом одержання виробничих біокатализаторів. На відміну від фізичних методів забезпечують міцний незворотній зв'язок ферменту з носієм і

супроводжується в більшості стабілізуванням молекули ензиму. В іммобілізації при цьому беруть участь функціональні групи, що не суттєві для його каталітичної функції.

До таких способів іммобілізації належить:

1. Іммобілізація ферментів на носіях, які мають гідроксогрупи. Найбільш поширеним методом утворення ковалентного зв'язку між ферментом та полісахаридним носієм або синтетичною сполукою є бром-ціановий метод.

2. Іммобілізація ферментів на носіях, що мають аміногрупи. Первинні аміногрупи носія, що зв'язані з ароматичним кільцем, попередньо перетворюють на солі діафонія, які потім піддають різним реакціям утворення. У ці реакції утворення вступають фенольні, імідазолні, аміні, гуанідінові, тіольні групи білків.

3. Іммобілізація на носіях, що мають активовані проізованні карбоксильної групи. Найбільш часто для зв'язування аміногруп білка з ацільними групами носія використовують ангідрити, галоген-ангідрити та інші проізованні карбонових кислот.

4. Іммобілізація на носіях, які мають сульфгідрильні групи. Сульфгідридні групи носія та ферменту легко окислюються з утворенням дисульфідних зв'язків під дією кисню повітря.

Іммобілізація за хімічними методами дуже ефективна, але ще малодоступна для виробничого використання, тому що важка та дорога.

**3.3. Іммобілізація клітин.** Методи іммобілізації універсальні для всіх видів іммобілізованих біокаталізаторів – індивідуальних ферментів, клітин, субклітинних структур, комбінованих препаратів.

У наш час велика увага надається іммобілізованим клітинам та субклітинним структурам. Це пояснюється тим, що при використанні іммобілізованих клітин немає необхідності виділяти та очищувати ферментні препарати, використовувати кофактори, виникає можливість одержання поліферментних систем, що проводять багатостадійні безперервно діючі процеси.

Імобілізовані клітини мікроорганізмів використовують для біотрансформації органічних сполук, розподілу рацемічних сумішей, гідролізу низки складних ефірів, інверсії сахарози, відновлення та гідроксилювання стероїдів.

Імобілізовані хроматофори використовують улабораторних умовах для синтезу АТФ, мембрани пурпурних бактерій – для створення штучних фотоелектричних перетворювачів, аналогів сонячних батарей, а іммобілізовані клітини дріжджів – для одержання етанолу з меласи.

З більш ніж 2000 відомих ферментів іммобілізовані та використовуються, в інженерній ензимології використовують близько десятиї частини (у більшості оксиредуктази, гідролази, трансферази).

**3.4. Виробничі процеси з використанням іммобілізованих ферментів та клітин.** Поєднання унікальних каталітичних властивостей ензимів з перевагами іммобілізованих ферментів як гетерогенних каталізаторів дозволило створити нові виробничі технологічні процеси. Слід зазначити, що всі вони належать до виробництва харчових продуктів та лікарських препаратів.

У світі розроблено такі великомасштабні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів та клітин:

1. Одержання глюкозофруктозних сиропів.
2. Одержання оптично активних L-амінокислот з їх рацемічних сумішей.
3. Синтез L-аспарагінової кислоти з фумату амонію.
4. Синтез L-аланіну з L-аспарагінової кислоти.
5. Синтез L-яблочної кислоти з фумарової кислоти.
6. Одержання безлактозного молока.
7. Одержання сахарів з молочної сироватки.
8. Одержання 6-аміногеніциланової кислоти.

Як приклад розглянемо один з них – одержання глюкозофруктозних сиропів.

Фруктоза є важливим у фізіологічному та технологічному відношенні природним моносахаридом. Вона у 2,5 рази солодша ніж глюкоза, у 1,7 разів солодша від очеретового цукру (сахарози), завдяки чому є менш калорійним

харчовим продуктом порівняно з сахарозою. Вона може використовуватися хворими на діабет, не викликає карієсу зубів, широко використовується в кондитерському виробництві.

Первинною сировиною для цього процесу є глюкоза, яку одержують при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю, за наявності мінеральних кислот. Для промислового біокатализатора глюкозоізомерази сорбують на пористих неорганічних носіях або іонообмінних смолах. У багатьох випадках іммобілізовані клітини різного походження (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. venezuelae*). Комерційні препарати іммобілізованої глюкозоізомерази мають вигляд гранул, волокон або аморфної маси. Найбільш ефективними біореакторами для одержання фруктози визнані апарати колонного типу. Виробництво такого реактора складає від 600 до 9000 кг глюкозофруктозного сиропу на 1 кг іммобілізованого ферменту залежно від чистоти сировини, а час напівінактивації каталізатора – 20–50 діб.

Сироп, що виникає результаті цього уміщує 42–45% фруктози, близько 51% глюкози, невелику кількість олігосахаридів.

Економічні розрахунки показують, що виробництво глюкозофруктозних сиропів з використанням іммобілізованої глюкозоізомерази в 1,5 разів є ефективнішим, ніж одержання сахарози з цукрових буряків за традиційної технології.

Крім перерахованих хімічних виробництв, які базуються на використанні іммобілізованих ферментів та клітин, ще багато виробництв, які розроблені промислово або як дослідні. До них належить: синтез сіалових кислот, гідроліз лантози, перетворення олігосахаридів на глюкозу, трансформація гідрокортизону на преднізолон, окиснення фенолу стоків, одержання білкових гідролізаців, одержання декстринів та ін.

Вуглеводна сировина використовується дуже широко, тому необхідні джерела поповнення. Одним з таких шляхів є перетворення целюлози на глюкозу. У природі існують целлюлозолітичні організми (бактерії, цвілеві гриби) та окремі види комах, які вміщують поліферментні комплекси целюлози та забезпечують гідроліз клітковини до глюкози.

Такі мікроорганізми наносять на целюлозний субстрат, що приводить до сорбції (імобілізації) на субстраті ферментів та розщеплення субстрату до глюкози. Процес здійснюється у проточних реакторах колонного типу, які щільно заповнені целюлозою. Розрахунки показують, що перевід цього процесу на виробничий рівень забезпечує одержання 24 т глюкози за добу.

Висока ефективність біологічних каталізаторів та специфічність їх дії роблять ферменти ідеальними реагентами для аналітичної хімії, які забезпечують визначення речовин при дуже низькій концентрації за наявності багатьох інших сполук. На основі цього створено штучні аналітичні системи (біосенсори, датчики, ферментні електроди, проточні аналізатори), які вміщують імобілізовані ферменти та клітини. Ці системи використовують у медицині, харчовій промисловості, наукових дослідженнях та інших сферах.

У медицині імобілізовані ферменти використовують для спрямованого транспортування лікарських засобів, при діалізі в апараті „штучна нирка”, при лікуванні ран, опіків, абсцесів у вигляді пропитки волокнистих матеріалів, як інгібітори в заміній терапії при лікуванні панкреатитів тощо.

### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Перерахувати особливості одержання ферментних препаратів залежно від джерела.
2. Схарактеризуйте використання препаратів різного ступеня очищення (неочищені, частково очищені, повністю очищені) та методи, які для цього використовують (на початкових та кінцевих стадіях).
3. Опишіть властивості ідеальних матеріалів для імобілізації ферментів.
4. Складіть загальну характеристику основних великомасштабних виробництв з використанням імобілізованих ферментів та клітин.
5. Складіть схему, яка відобразить класифікацію носіїв за їх природою, їх властивості, переваги та недоліки тощо.



6. Схарактеризуйте методи іммобілізації ферментів, результати занесіть у таблицю „Методи іммобілізації ферментів” (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Методи іммобілізації ферментів**

Методи іммобілізації ферментів, їх основа	Варіанти іммобілізації	Сутність, недоліки, переваги, використання
Фізичні основуються на	Адсорбція ферментів на нерозчинному носії	
	Іммобілізація шляхом включення в гель	
	Іммобілізація ферментів у напівпроникних структурах: 1) мікрокапсулювання; 2) включення ферментів у ліпосоми.	
Хімічні основуються на	Іммобілізація ферментів на носіях, що мають гідроксогрупи	
	Іммобілізація ферментів на носіях, які мають аміногрупи	
	Іммобілізація на носіях, що мають активовані похідні карбоксильної групи	
	Іммобілізація на носіях, що мають сульфгідрильні групи	

7. Розгляньте та підпишіть складові частини схеми, яка ілюструє одержання частково очищеного препарату  $\beta$ -галактозидази з мутанту *E. coli*.

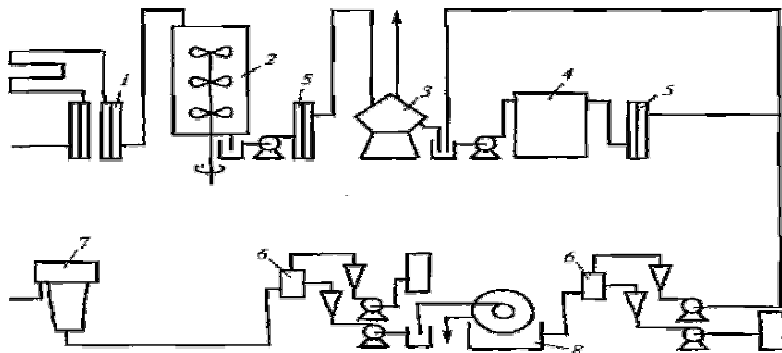


Рис. 4.1. Технологічна схема безперервного одержання  $\beta$ -галактозидази з клітин *E. coli* (за Єгоровою, 2003):

- |    |    |
|----|----|
| 1- | 5- |
| 2- | 6- |
| 3- | 7- |
| 4- | 8- |

#### Література:

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988. – 479 с.
2. Биотехнология / Е. С. Воронин. – СПб. : ГИОРД, 2008. – 704 с.
3. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология : векторные системы молекулярного клонирования / М. Р. Альтхерр, П. К. Балбас, Р. М. Берка и др. – М. : Агропромиздат, 1991. – 532 с.
5. Смирнов В. В. Биотехнология : настоящее и будущее / В. В. Смирнов. – К. : Знание, 1986. – 48 с.

## **Тема № 5: БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА МЕТАБОЛІТІВ**

**Мета:** визначити сутність реакцій біотрансформації, шляхи забезпечення надсинтезу одного з продуктів метаболізму та шляхи координації всіх хімічних перетворень у клітині.

**1. Механізми одержання продуктів клітинного метаболізму.**

**2. Біотехнологія одержання первинних метаболітів**

**3. Біотехнологія одержання вторинних метаболітів.**

**1. Механізми одержання продуктів клітинного метаболізму.** Основою одержання продуктів клітинного метаболізму є реакції біотрансформації.

Реакціями (процесами) біотрансформації називають реакції перетворення вихідних органічних сполук (попередників) на цільовий продукт за допомогою клітин живих організмів або ферментів, які виділені з них.

Сьогодні ці реакції знайшли широке використання для широкомасштабного виробництва амінокислот, антибіотиків, стероїдів та інших продуктів.

Продуктами біотехнологічного виробництва є:

1. Високомолекулярні речовини, що виділені з клітин, тканин, органів (білки, ферменти, полісахариди, полієфіри й т. ін.).

2. Низькомолекулярні речовини – продукти клітинного метаболізму, які поділяють на:

– первинні метаболіти – речовини необхідні для росту клітин (амінокислоти, нуклеотиди, моносахариди, вітаміни, коферменти, органічні кислоти);

– вторинні метаболіти – речовини, не потрібні для виживання, які утворюються після закінчення росту (антибіотики, пігменти, токсини).

Центральною ланкою біотехнологічного процесу є жива клітина, у якій синтезується одночасно багато речовин.

Завдання біотехнології полягає в забезпеченні надсинтезу одного продукту метаболізму. Цього можна досягнути зміною генетичної програми організму або порушенням регуляторних систем метаболізму в ньому.

Зміна генетичної програми може відбуватися:

- у наслідок спонтанних змін геному;
- при сліпому селекційному відборі;
- при штучному пошкодженні геному шляхом індукованого мутагенезу.

Координація всіх хімічних перетворень у клітині мікроорганізмів здійснюється за трьома механізмами:

1) регуляцією активності ферментів, зокрема й ретроінгібуванням (інгібуванням за типом зворотного зв'язку). Сутність цієї регуляції полягає в тому, що активність ключового перетворення субстрату гальмується концентрацією кінцевого метаболіту.

Для порушення цієї регуляції використовують аналоги кінцевих продуктів, під впливом яких утворюються організми з порушеним метаболізмом (не чутливі до концентрації кінцевого продукту).

Для одержання об'єктів продуценти вирощують на селективному середовищі, яке вміщує необхідний аналог або антиметаболіт (не включаються до обміну речовин), що призводить до зниження росту організму.

Мутанти, які вижили, мають дефекти в механізмі регуляції активності ферментів за принципом зворотного зв'язку і, є важливими об'єктами в забезпеченні надсинтезу цільового продукту.

2) регуляцією об'єму синтезу ферментів (індукція та репресія біосинтезу ферментів). Серед тисяч ензимів, які притаманні мікроорганізмам, одні синтезуються постійно (конститутивні), інші виникають тільки за наявності окремих субстратів у середовищі (адаптивні, індукцібельні). Так, поява в середовищі  $\beta$ -лактозида-лактози викликає у кишкової палиці миттєву появу  $\beta$ -галактозидази.

Регуляція обсягу синтезу ферментів здійснюється шляхом зміни кількості і-РНК, яка утворюється при

транскрипції на рівні оперона. Оперон – це впорядкована сукупність структурних генів та регуляторних ділянок. До складу регуляторної зони оперона належить ген-регулятор, промотор, посилювач транскрипції та інші компоненти.

3) регуляція катаболітичної репресії. Сутність цього процесу полягає в тому, що коли в середовищі наявні кілька джерел вуглецю, то спочатку клітини виробляють ферменти, які забезпечують утилізацію більш оптимального субстрату, потім менш оптимального субстрату. В основі цього процесу міститься репресія структурних генів одного субстрату іншим. Катаболітична репресія опосередкується дією спеціального білка-активатора катаболітичних генів.

## **2 .Біотехнологія одержання первинних метаболітів**

**2.1. Виробництво амінокислот.** Серед сполук, які одержують біотехнологічними методами, амінокислоти займають перше місце за обсягом виробництва та друге місце – за ціною після антибіотиків.

Обсяг світового виробництва амінокислот складає більше 500 тис. т за рік, з яких – 300 тис. т – глютамату-натрію, 100 тис. т – лізину, 140 тис. т – метіоніну. Але цей обсяг є лише малою частиною від потрібної кількості.

Амінокислоти, що виробляють, використовують як сировину для хімічного, парфумерного, фармацевтичного виробництв, при виробництві харчових домішок, приправ, підсилювачів смаку та інших.

При виробництві білків амінокислоти одержують:

- 1) гідролізом природної білок умісної сировини;
- 2) хімічним синтезом;
- 3) мікробіологічним виробництвом;
- 4) хіміко-мікробіологічним методом.

При гідролізі білок умісної сировини (відходи харчового та молочного виробництва) нагрівають з розчинами кислот або лугів при температурі 100–105°C протягом 20–48 годин. Частіше використовують 20% розчин соляної кислоти, яка забезпечує глибокий гідроліз білка. Крім того, для прискорення реакцій гідролізу білка використовують іммобілізовані протеолітичні

ферменти та іонообмінні смоли. Одержані білкові гідролізати використовують у медицині, тваринництві, харчовій та мікробіологічній промисловості. До недоліків методу належать розпад деяких амінокислот (цистеїну, тирозину), високі збитки.

Суттєвим недоліком хімічного синтезу є те, що цільові препарати одержують у вигляді рацемічної суміші.

Найбільш перспективним та економічним методом є мікробіологічний синтез амінокислот. Основна перевага цього методу полягає в тому, що одержують L-амінокислоти на основі відновлювальної сировини. За цим методом виробляють близько 60% усіх високоочищених амінокислот.

В останні роки при виробництві амінокислот усе більше використовують біотрансформацію попередників амінокислот, особливо за допомогою іммобілізованих ферментів або клітин мікроорганізмів, які одержують хімічним шляхом.

Промислове виробництво амінокислот стало можливим після відкриття здатності окремих мікроорганізмів виділяти в культивоване середовище значну кількість амінокислоти (С. Кінсіта, 1955).

Існує багато мікроорганізмів, які здатні синтезувати та виділяти окремі амінокислоти, але кількість їх виділень мала, тому необхідно досліджувати багато штамів та знаходити здатність до надсинтезу. Потім перспективні штами покращують селекцією та трансформацією.

**2.2. Мікробіологічні методи виробництва окремих амінокислот.** Однією з амінокислот, яку виробляють мікробіологічним методом, є лізин. Виробництво лізину в нашій країні було організовано першим, тому що в кормах із зернових культур його дефіцит складає 20–50%. Багатотоннажне виробництво лізину налагоджено в Іспанії, Франції, Японії та США.

У клітинах мікроорганізмів лізин синтезується з аспарагінової кислоти та є ланкою в біосинтезі метіоніну, треоніну та лізину.

Основним ферментом цього процесу є аспартаткіназа, яка діє за принципом зворотного зв'язку. Для утворення лізину в більшій кількості використовують мутантів першого типу

(блокують синтез ферменту для утворення треоніну та метіоніну) та другого типу (дефекти за структурним геном, який регулює зворотний зв'язок аспартаткінази, тому не чутливий до високих концентрацій). Важливим фактором, який забезпечує підвищену концентрацію амінокислоти в культуральній речовині є висока проникливість клітинних мембран. Проникливість клітинних мембран підвищують за допомогою мутацій або зміною складу середовища.

Для зниження собівартості в поживному середовищі використовують бурякову меласу, молочну сироватку, гідролізати крохмалю, сульфідні луги, оцтову кислоту, метанол, етанол, сечовину, солі амонію, екстракти кукурудзи, дріжджей, вітаміни групи В та інші.

Аерація здійснюється стерильним повітрям за рахунок діяльності турбінних мішалок. Ступінь аерації при виробництві, індивідуальний для кожної амінокислоти. Біомаса продуценту формується в посівних апаратах за 24 години при рН 7,0–7,2; t 28–30°C, і подається в ферментер з поживним середовищем. Лізин починає надходити в середовище через 25–30 годин після початку ферментації. Після завершення процесу ферментації (через 55–72 години) рідку фазу відділяють від культури фільтруванням.

Високоочищені препарати лізину одержують після фракціонування фільтрату культуральної рідини шляхом іонообмінної хроматографії на катіоніті.

Крім високо очищених препаратів лізину одержують інші види його товарної форми: рідкий концентрат лізину (РКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ) та висококонцентровані кормові препарати, які характеризуються порівняно меншим ступенем очищення.

Другою за значущістю незамінною амінокислотою для харчування людини та тварин є метіонін, який одержують у більшості хімічним синтезом, що більш економічно.

Мікробіологічним методом одержують також триптофан, аргінін, глутамінову кислоту, глутамін, треонін, пролін та окремі інші амінокислоти.

**2.3. Хіміко-мікробіологічні (хіміко-ферментативні) методи одержання амінокислот.** При одержанні низки амінокислот використовують ензими, що належать до більшості мікроорганізмів.

Використання ферментів у виробництві амінокислот забезпечує стереоспецифічність процесів їх синтезу, що вигідно відрізняє біотехнологічні виробництва від хімічних.

Процес одержання L-лізину заснований на стереоспецифічному ферментативному гідролізі (конверсії) D, L –  $\alpha$ -аміно-капролактама, який одержують хімічним шляхом.

Рацемат використовують як субстрат, який під дією ферменту лактомази L –  $\alpha$ -аміно-капролактамагідролази перетворюється в L –лізин. Цей фермент знайдено в окремих видах дріжджей (*Candida laurentii*).

Та частина, що не прореагувала (D-форма), переводиться під впливом рацемази у суміш антиподів (D та L –  $\alpha$ -аміно- $\epsilon$ -капролактама). Рацемаза знайдена в низці бактерій (*Alcaligenes obae*).

Розроблено іммобілізовані форми обох ферментів. При виробництві лізину у водний розчин D, L –  $\alpha$ -аміно- $\epsilon$ -капролактама одночасно у водять джерела лактамази та рацемази, яка вміщується у дріжджових та бактеріальних клітинах. Процес здійснюється при температурі 30–50°C, рН 8,0–8,5 та оптимальній аерації. На виході з реактора утворюється в основному лізин, який виділяють з суміші, очищують, сушать. Після завершення процесу вміст амінокислоти в реакційному середовищі складає більше 150 г/л.

Крім того, в утворених мутантів цільовий продукт лізин далі не міститься в обмін речовин, що збільшує вихід цільового продукту.

Набір ензимів, який використовують для одержання амінокислот, достатньо різноманітний. До їх числа належать гідролази, дегідрогенази, ліази, лігази, ізомерази.

Перелік цільових амінокислот, які виробляють за хіміко-ферментативним способом різноманітний – L-аспарагінова амінокислота, L-аланін, L-глутамін, L-лізин, L-триптофан, L-



цистеїн, L-метіонін, L-фенілаланін. Цей метод порівнянно з мікробіологічним більш специфічний, не потребує очищення амінокислот та стічних потоків. Однак за вартістю сировини та ферментативних препаратів хіміко-ферментативний спосіб дещо уступає мікробіологічному способу.

**2.4. Одержання вітамінів.** Вітаміни не утворюються у гетеротрофів, але належать до групи незамінних органічних сполук різної хімічної природи, які необхідні для каталітичної та регуляторної функції. Їх недолік порушує обмін речовин та нормальні процеси життєдіяльності організму. Здатність до синтезу вітамінів належить тільки автотрофам (рослинам, багатьом мікроорганізмам).

Завдяки вивченню фізіології, генетиці мікроорганізмів-продуцентів вітамінів створена теоретична основа для одержання мікробіологічним засобом практично всіх вивчених вітамінів.

Але за допомогою ензимів краще виробляти тільки особливо складні за будовою вітаміни: B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, β-каротин (вітамін А), попередники вітаміну D. Інші вітаміни виділяють або з природних джерел або синтезують хімічним шляхом.

Розглянемо особливості одержання вітаміну B<sub>2</sub> (рибофлавіну). Активним продуцентом рибофлавіну є гриб *Eremothecium ashbyii*, який виявлений у 1935 році. Він здатний при вирощуванні на 1 т поживної суміші синтезувати 25 кг вітаміну B<sub>2</sub>.

Надсинтезу рибофлавіну досягають шляхом дії на дикі штами мутагенів та зміною складу культурального середовища. Відбір мутантів здійснюють за стійкістю до аналогу рибофлавіну – розеофлавіну.

До складу середовища для росту продуцентів вітаміну B<sub>2</sub> належить соєва мука, кукурудзяний екстракт, сахароза, карбонат кальцію, хлорид натрію, гідрофосфат калію, вітаміни, технічний жир. Перед подачею середовища до ферментера його стерилізують, додаючи антибіотики та антисептики.

Як посівний матеріал використовують спори *E. ashbyii*, які вирощені на пшоні (7–8 діб при 29–30°C) у посівному апараті. Процес ферментації грибів здійснюється в ферментері

протягом 3-х діб при температурі 28–30°C. Концентрація рибофлавіну в культуральній рідині може досягати 1,4 мг/мл. Після завершення процесу ферментації культуральну рідину концентрують у вакуумі, висушують на розпилювальній суміші (вологість 5–10%) та змішують з наповнювачами.

У найближчі роки спостерігатиметься розширення набору вітамінів, які одержують за методом біотехнології. Для вирішення проблеми виробничого одержання вітамінів необхідним є впровадження нехарчової сировини, розробка спеціальних режимів культивування над продуцентів, переклад процесів на безперервні технології, використання перспективних хіміко-ферментативних способів синтезу вітамінів.

**2.5. Виробництво органічних кислот.** У наш час біотехнологічними способами у виробничих масштабах синтезують низку органічних кислот. З них лимонну, глюконову, кетоглюконову та ітаконову кислоти одержують тільки мікробіологічним способом, молочну, саліцилову та оцтову – як хімічним, так і мікробіологічним способами, а яблучну – хімічним та ензиматичним шляхом.

Лимонну кислоту широко використовують у харчовому, фармацевтичному, косметичному та інших виробництвах. Обсяг світового виробництва цитрату складає 400 тис. т/рік. Найбільший виробник лимонної кислоти – США. Для промислового виробництва лимонної кислоти використовують культуру гриба *Aspergillus niger*, а також *A. wentii*.

Метаболічним джерелом лимонної кислоти в організмі служить цикл трикарбонових кислот.

Ріст культури грибів регулюється шляхом зміни вмісту фосфату, іонів марганцю, заліза, цинку. Дефіцит фосфатів приводить до над продукції цитрату, а іонів металів – змінює властивості клітинних мембран та морфологію гіф.

Процес ферментації, з утворенням лимонної кислоти, здійснюють при низьких значеннях рН 3–4.

Поживні середовища для культивування продуцентів лимонної кислоти як джерела вуглецю вміщують меласу, крохмаль та глюкозний сироп.

Існує кілька технологічних варіантів промислового виробництва лимонної кислоти – поверхнева ферментація та глибинна культивуація. Наприкінці культивуації масу міцелію відділяють шляхом фільтрування та промивають. Потім з маточного розчину виділяють лимонну кислоту у формі середньої солі, яка кристалізується з чотирма молекулами води. Вільну кислоту видаляють з промитих кристалів солі після обробки сульфатом кальцію. Високоочищені препарати лимонної кислоти одержують після додаткової процедури очистки методом іонообмінної хроматографії. Вихід продукту складає 85%.

Нові можливості для інтенсифікації виробничих процесів одержання органічних кислот відкриває використання іммобілізованих ферментів та клітин мікроорганізмів.

### **3. Біотехнологія одержання вторинних метаболітів.**

Принцип одержання вторинних метаболітів базується на особливостях їх утворення клітинами мікроорганізмів. Біосинтез вторинних метаболітів фазоспецифічний та здійснюється після завершення стадії росту, в ідіофазі, тому їх називають ще ідіометами. Серед вторинних метаболітів провідне місце за обсягом виробництва займають антибіотики.

**3.1. Виробництво антибіотиків.** У світі щорічно виробляється антибіотиків на 20 млрд. доларів. До антибіотиків належать низькомолекулярні ефектори природного походження, які здатні подавляти ріст живих клітин. У хімічному відношенні вони представляють зібрану групу органічних речовин. Залежно від хімічної природи й низки інших властивостей антибіотики поділяють на такі класи:

1. Тетрацикліни (тетрациклін, метациклін).
2. Макроліди (еритроміцин, амікацин).
3. Аміноглікозиди (гентаміцин, амікацин).
4.  $\beta$ -лактоми (пеніциліни, цефалоспорини).
5. Глікопептиди (ванкоміцин, ристоміцин).
6. Амфеніколи (левоміцетин).
7. Лінкосамід (лінкоміцин).
8. Полієнові (ністатин, леворин).

9. Протипухлинні (блеоміцин) та ін.

Процес культивування ідіолітів здійснюється двома фазами (двоступеневе культивування). У першій фазі здійснюється накопичення достатньої кількості біомаси, яка вирощується на середовищі для росту мікроорганізму. Ця фаза повинна бути швидкою, а поживне середовище дешевим. У другій фазі здійснюється запуск і активний синтез антибіотиків. У цій фазі ферментацію здійснюють на продуктивному середовищі.

Утворення антибіотиків регулюється умовами культивування мікроорганізмів. Багато антибіотиків беруть свій початок від проміжних сполук обміну первинних метаболітів, тому їх біосинтез регулюється шляхом ретроінгібування.

Більшість антибіотиків одержують при глибинній аеробній ферментації періодичної дії в асептичних умовах. Період ферментації триває 7–10 діб. В останні роки уводять напівбезперервні та неперервні процеси ферментації. Технологія кінцевих стадій процесу визначається природою антибіотика, характером виробництва та метою подальшого використання антибіотиків.

Для медичних цілей технологія очищення містить: екстракцію антибіотиків розчинниками, осадження та перекристалізацію з різних середовищ, фракціонування на іонообмінних смолах, ліофілну та розпилену в сушці готових препаратів.

Антибіотики виділяють або у вигляді порівняно неочищених препаратів (натрієва сіль пеніциліну) або у вигляді високо очищених речовин (прокаїнова сіль пеніциліну).

Вихід антибіотиків звичайно складає кілька десятків грамів на 1 л.

### **3.2. Одержання виробничо важливих стероїдів.**

Здатність клітин мікроорганізмів до складних процесів біотрансформації найбільш повно реалізується при одержанні виробничо важливих стероїдів.

Біотрансформація зазвичай полягає в селективному впливі на одне з положень стероїдного скелету.

На процесах мікробної біотрансформації стероїдів базується технологія спрямованого гідроксилювання (11- $\alpha$ -гідроксилювання) прогестерону за участі гідрогенази *A. oshraceus*. Значущість цієї мікробної трансформації визначається тим, що процеси гідроксилювання кортикостерону та його похідних містяться в основі промислового одержання багатьох цінних продуктів (протизапальних, протипухлинних препаратів, транквілізаторів, анестезуючих засобів, статевих гормонів та ін.).

Так, промислове виробництво протизапального препарату преднізолону здійснюється шляхом мікробного гідроксилювання кортикостерону.

Правильність перетворення стероїдного субстрату контролюють сумісно хімічним підходом зі специфічністю біологічної системи.

Важливе джерело стероїдних гормонів – культура клітин рослин. Так, культура клітин діоскореї дельтовидної (*Dioscorea deltoidea*) кореневого походження продукує фітостерин діогенін і його глікозидні похідні (сапоніни). Таким чином, культивування клітин рослин *in vitro* може бути новим вирішення проблеми промислового одержання вторинних метаболітів.

Середовища для біотрансформації мають достатньо складний склад, а реакція потребує суворий контролю за кожним параметром (рН, часом і т. ін.).

Розробка крупномасштабного виробництва преднізолону шляхом біотрансформації стероїдів надала можливість знизити вартість цього препарату в 200 разів.

Подальші успіхи у виробництві стероїдних препаратів пов'язують з використанням іммобілізованих клітин, використанням оптимального співвідношення біологічних та хімічних перетворень, а також удосконалення технології очищення сполук, які одержуємо.

### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Схарактеризуйте реакції біотрансформації як основу одержання продуктів клітинного метаболізму.

2. Перерахуйте продукти, які одержують за реакціями біотрансформації.

3. Перерахуйте шляхи забезпечення надсинтезу одного з продуктів метаболізму та шляхи координації всіх хімічних перетворень у клітині (регуляція катаболітичної репресії, обсягу синтезу ферментів, активності ферментів).

4. Опишіть сутність мікробіологічного методу виробництва окремих амінокислот, його переваги (на прикладі лізину).

5. Схарактеризуйте сутність хіміко-мікробіологічного методу виробництва окремих амінокислот, його особливості.

6. Зазначте, які вітаміни та органічні кислоти виробляють за мікробіологічним методом, а які – за хімічними, ензиматичними шляхами.

7. Опишіть сутність, сировину та особливості одержання вітамінів В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>, β-каротину, попередників вітаміну D, лимонної, глюконової, кетоглюконової та ітаконової кислот (за вибором).

8. Схарактеризуйте процеси одержання вторинних метаболітів за участю клітин мікроорганізмів.

9. Схарактеризуйте особливості стадій одержання антибіотиків.

10. Визначте особливості одержання виробничоважливих стероїдів.

### **Література:**

1. Биотехнология / Е. С. Воронин . – СПб. : ГИОРД, 2008. – 704 с.

2. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988 . – 479 с.

3. Березин И. В. Инженерная энзимология / И. В. Березин, А. В. Клесов. – М. : Высшая школа, 1987. –384 с.

4. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.

5. Смирнов В. В. Биотехнология : настоящее и будущее / В. В.Смирнов. – К. : Знание, 1986. – 48 с.

## ПИТАННЯ ДО ПЕРШОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ:

1. Предмет і завдання біотехнології. Використання наукових досліджень у галузі фізико-хімічної біології та фундаментальних біологічних дисциплін у біотехнології.

2. Відмінності сучасної біотехнології від традиційних мікробіологічних виробництв. Економічні та соціальні аспекти розвитку біотехнології.

3. Об'єкти генної та клітинної інженерії. Нові об'єкти біотехнології.

4. Перспективи розвитку біотехнології в найближчі роки.

5. Біотехнологічні процеси в харчовій промисловості.

6. Біотехнологія у молочній промисловості. Виготовлення молочнокислих продуктів, сиру, молочного цукру.

7. Біотехнологія у виробництві сахарози та її замінників.

8. Біотехнологія у виробництві харчових кислот.

9. Дріжджі і продукти дріжджового бродіння. Виробництво алкогольних напоїв.

10. Використання біотехнологічних процесів для вирішення проблем навколишнього середовища.

11. Екологічна біотехнологія та її завдання.

12. Біотрансформація ксенобіотиків і речовин, що забруднюють навколишнє середовище.

13. Одержання екологічно чистої енергії. Біогаз.

14. Особливості виробництва етанолу як одного з видів екологічно чистої енергії.

15. Одержання екологічно чистої енергії шляхом перетворення сонячної енергії.

16. Особливості одержання екологічно чистої енергії шляхом фотовиробництва водню.

17. Використання методів екологічної біотехнології для очищення стічних вод.

18. Класифікація продуктів біотехнологічних виробництв.

19. Характеристика стадій біотехнологічного виробництва.
20. Сутність та особливості стадії біотехнологічного виробництва.
21. Особливості складання схеми біотехнологічного виробництва.
22. Особливості біотехнології виробництва метаболітів.
23. Механізми інтенсифікації процесів отримання продуктів клітинного метаболізму
24. Методологія селекції мутантів з дефектами експресії генів і регуляції обміну речовин.
25. Особливості біотехнології отримання первинних метаболітів.
26. Біотехнологічні процеси виробництва амінокислот.
27. Біотехнологічні процеси отримання вітамінів.
28. Біотехнологічне отримання органічних кислот.
29. Біотехнологія отримання вторинних метаболітів.
30. Особливості біотехнологічного виробництва антибіотиків.
31. Одержання промислово важливих стероїдів.
32. Загальна характеристика біоіндустрії ферментів.
33. Технологія культивування мікроорганізмів – продуцентів ферментів.
34. Особливості технології виділення й очищення ферментних препаратів.
35. Сутність та характеристика інженерної ензимології.
36. Особливості та призначення іммобілізованих ферментів.
37. Особливості та призначення іммобілізації клітин.
38. Характеристика процесів з використанням іммобілізованих ферментів і клітин.



# МАТЕРІАЛИ ДО ДРУГОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ

## Тема № 6: ОСНОВИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

**Мета:** визначити основні методи генетичної інженерії. Схарактеризувати системи перенесення генетичного матеріалу. Дати характеристику клонування генів та процесів їх ідентифікації та експресії. Визначити основні напрями використання досягнень генетичної інженерії в різних сферах.

- 1. Біотехнологія рекомбінантних ДНК та їх конструювання.**
- 2. Клонування та експресія чужорідних генів в різних організмах.**
- 3. Використання генної інженерії.**

Генна інженерія – це напрям молекулярної генетики, який досліджує можливості та способи створення лабораторним шляхом (*in vitro*) генетичних структур і спадково змінених органів.

Існують дві назви (у загальному сенсі синоніми):

- генетична інженерія – займається створенням рекомбінантної ДНК шляхом з'єднання фрагментів;
- генна інженерія – працює тільки з генами.

Рекомбінантна ДНК – це молекула ДНК, яка отримана зовні живими клітинами шляхом з'єднання природних або синтетичних фрагментів ДНК з молекулами, що здатні реплікувати в клітині. Перша рекомбінантна ДНК отримана в 1972 році П. Бергом. Ця дата є датою народження генетичної інженерії. А вже в 1973 році у США було сформульовано послання учасників Гордонівської конференції, яке попереджувало США про можливу небезпеку цієї технології.

У 1975–1977 роках Сенгер, Баррел розробили методи швидкого визначення нуклеотидної послідовності. У 1981–1982 роках. Пальмітер, Брінстер, Рубін отримали трансгенні

організми мишей, дрозоділи. А в 1993 році Ернст, Брем, Прокоф'єв одержали трансгенних вівць.

**1. Біотехнологія рекомбінантних ДНК та їх конструювання.** Створення рекомбінантних ДНК здійснюється за рахунок використання нових та таких методів, які застосовують інші дисципліни. До найбільш важливих методів біотехнології рекомбінантних ДНК належить:

1. Специфічне розщеплення ДНК рестрикуючими нуклеазами, що прискорює виділення різних генів і маніпуляції з ними.

2. Швидке секвенування всіх нуклеотидів в очищеному фрагменті ДНК, що дозволяє визначити точні межі гена й амінокислотну послідовність поліпептиду, яку він кодує.

3. Гібридизація нуклеїнових кислот, яка дозволяє з більшою точністю виявити специфічні нуклеотидні послідовності на основі їх здатності зв'язувати комплементарні основи.

4. Клонування ДНК, сутність якого полягає у введенні ДНК-фрагменту в самореплікуючий генетичний апарат (плазміді або віруси), який використовують для трансформації бактерій. Бактеріальна клітина після трансформації здатна продукувати цей фрагмент у багатьох ідентичних копій.

5. Методи, що дозволяють отримувати модифіковані версії генів і потім упроваджувати їх у клітини або організми.

Технологія рекомбінантних ДНК дозволяє визначати будову і функції білків, розшифрувати механізми регуляції експресії генів, отримувати білки, які беруть участь у регуляції обмінних процесів і т. ін.

Усі ферменти, що беруть участь у зміні ДНК, поділяють на ті, що:

1) використовуються для отримання рекомбінантних ДНК;

2) синтезують фрагменти ДНК на матриці РНК;

3) з'єднують фрагменти ДНК;

4) дозволяють здійснити зміну структури кінцевих фрагментів ДНК;

5) використовуються для приготування гібридаційних проб.

Розщеплення ДНК у специфічних ділянках нуклеотидних послідовностей здійснюється ферментами – рестрикціуючими нуклеазами.

Назва рестриктаз складається з першої букви назви роду і двох виду, до якого належить. Наприклад, фермент *E. coli* має назву Eco.

Кожен фермент упізнає 4–6 специфічних послідовностей.

Більшість ферментів розриває тільки двунитіві ДНК, з утворенням серії фрагментів (рестрикт або рестрикційних) з тупими або липкими кінцями:

<b>тупі кінці</b>	<b>липкі кінці</b>
$5^1\text{-X-T-T-A-A-X}_1\text{-}3^1$	$5^1\text{-X-T-T-A-A-X}_1\text{-}3^1$
$3^1\text{-X}_1\text{-A-A-T-T-X-}5^1$	$3^1\text{-X}_1\text{-A-A-T-T-X-}5^1$

X<sub>1</sub> – сукупність нуклеотидів.

Фрагменти з липкими кінцями, тобто розірвані зі зміщенням на кілька нуклеотидів, з'єднуються легше.

За порівнянням фрагментів ДНК, після обробки ділянки геному набором рестриктаз, складають реструкційну карту (яка відображає розташування певної послідовності нуклеотидів на цій ділянці). Реструкційні карти використовують:

- для визначення гомологічності окремих генів;
- при клонуванні, вирішенні еволюційних та філогенетичних завдань.

У генетичній інженерії велике значення має секвенування (визначення послідовності нуклеотидів у нуклеїнових кислотах, амінокислот у білках). Для цього використовують два методи:

1) хімічний – вихідний фрагмент ДНК, мічений за 5<sup>1</sup>-кінцем, піддається специфічному розщепленню за певним нуклеотидом; ця операція виконується на чотирьох пробах, з використанням агентів, які розщеплюють за різними

нуклеотидами.

2) ензиматичний метод секвенування заснований на ензиматичному введенні нуклеотиду, який термінує полінуклеотидний ланцюг; для цього використовують модифікований нуклеотид без дезоксирибози-3<sup>1</sup>-ОН, що зумовлює приєднання таких нуклеотидів після його впровадження.

Найважливішим методом отримання рекомбінантних ДНК є:

1) нагрівання до 100°C у лужному середовищі комплементарних пар ДНК (денатурація ДНК, „плавлення”);

2) витримання комплементарних ланцюгів при температурі 65°C (їх сполучення, відновлення подвійної спіралі, гібридизація, ренатурація, „отжиг”); швидкість ренатурації залежить від концентрації комплементарних нуклеотидних послідовностей.

Для ідентифікування нуклеотидних послідовностей використовують уведення одноланцюгової молекули ДНК (мічений індикатор, ДНК-зонд, який містить радіоактивний елемент).

ДНК-зонди застосовують для:

- ідентифікації нуклеотидних послідовностей з низькою концентрацією;

- пошуку споріднених генів;

- виявлення комплементарних молекул ДНК.

Обмін генами й уведення гена в клітину ґрунтується на важливій властивості ДНК – здібності до перебудов, що змінює комбінацію генів у геномі та їх експресію (забезпечує пристосування до зміни умов).

1) загальну рекомбінацію (генетичний обмін у ДНК здійснюється між гомологічними нуклеотидними послідовностями). Наприклад, між двома копіями однієї і тієї ж хромосоми мейоз (кросинговер) або при схрещуванні, перегрупування генів у бактерій;

2) сайт-специфічна рекомбінація (в обмін вступають короткі специфічні нуклеотидні послідовності однієї і тієї ж або обох спіралей ДНК, розпізнавання особливим сайт-специфічним

ферментом, що забезпечує трансформацію нуклеотидних послідовностей у геномі).

Будь-які комплементарні взаємодії між гомологічними спіралями ДНК можливі лише при розриві одного з ланцюгів.

До чинників, які викликають одноланцюгові розриви, належить дія:

– хімічних агентів;

– окремих видів випромінювання;

– специфічних білків (так, білок гес приєднується до подвійної спіралі ДНК з боку 5<sup>1</sup> і гідролізує – поділяє ланцюг з утворенням „вуса”, досягнувши ділянки-сайту, „вус” – відривається, цей „вус” ініціює подальшу генетичну рекомбінацію; потім працює білок геса, який зв’язує поодинокі ланцюги ДНК, завдяки цьому білку можливий обмін між одноланцюговою ДНК і дволанцюговою ДНК, обмін здійснюється за законами генетики (кросинговер, ізомеризація).

Сутністю генетичної інженерії є цілеспрямоване конструювання генетичних систем поза організмом та їх упровадження в живий організм.

Одним з важливих етапів конструювання ДНК є лігування (зшивання) генів за допомогою ферменту ДНК-лігази. Воно здійснюється:

1) зшиванням фрагментів (генів) ДНК за „липкими” кінцями тобто взаємокомплементарним;

2) за допомогою штучно побудованих „липких” кінців; за відсутності „липких” кінців їх побудовують, (синтезують) штучно, з використанням лінкерів (перехідників) – коротких ділянок ДНК, що мають різні „липкі” кінці;

3) зшиванням фрагментів за тупими кінцями, коли кінці фрагмента дволанцюгові (ефективність нижча, має біохімічні особливості).

Після зшивання ДНК вводять у живі клітини, але вона не здатна до відтворення і її руйнують внутрішньоклітинні нуклеази.

Для запобігання цьому:

1) вона повинна вбудуватися в геном і реплікувати за його рахунок;

2) або володіти автономною реплікацією.

Для цього використовують вектори.

Молекули ДНК, які здатні акцептувати сторонню ДНК і реплікувати автономно, називають векторними молекулами. Векторами можуть бути плазміди, бактеріофаги, віруси тварин.

Так, плазміди складають 1–3% геному бактеріальної клітини, вони забезпечують додаткові властивості. Існують різні види плазмід:

- R-плазміди (забезпечують стійкість до антибіотиків);
- D-плазміди (забезпечують стійкість до біодеградації);
- Col-плазміди (синтез коліцинів, які подавляють інші штами);
- FP (забезпечують статевий процес).

Кількість плазмід коливається від 1 до 100 і більше.

Перший плазмідний вектор був отриман в 1973 році Коеном.

Сьогодні плазмідні вектори характеризуються найбільшим використанням.

Еукаріотичні віруси використовуються менше. На практиці часто використовується онкогенний вірус SV 40 і його похідні. Вони являють собою дефектні віруси, які не здатні давати повноцінні вірусні частки.

З фагів найбільш часто використовують похідні фага  $\lambda$ , M 13; fd.

Кожен вектор містить міжгенну послідовність, не важливу для життєдіяльності, куди й упроваджують за допомогою лігаз сторонню ДНК.

Векторні плазміди і векторні віруси з вбудованими чужорідними генами називають гібридними (химерними) плазмідами (фагами).

Потім їх уводять у рослинну, тваринну, грибову, бактеріальну клітину. Для цього клітини обробляють сполуками, що зумовлюють проникнення ДНК усередину клітин ( $\text{CaCl}_2$ ) і вміщують у середовище, у якому виживають тільки векторні клітини.

Процес інфікування клітин чужорідною ДНК, що приводить до утворення зрілого фагового потомства, називають

трансфекцію.

Крім методу ідентифікації на поживних середовищах використовують метод за визначенням синтетазних продуктів, а також шлях гібридизації нуклеотидної вставки.

**2. Клонування та експресія генів у різних організмах.** Сутність генетичної інженерії зводиться до спрямованого конструювання генетичних систем поза організмом з подальшим уведенням їх у живий організм. При цьому рекомбінантні ДНК стають складовою частиною генетичного апарату реципієнтного організму і привносять до нього нові генетичні та фізіолого-біохімічні властивості, які корисні для людини. До таких властивостей можна віднести синтез окремих амінокислот, білків, гормонів, ферментів, вітамінів тощо.

Один з найважливіших етапів конструювання молекули ДНК є лігування (або зшивання) генів за допомогою ферменту ДНК-лігази. Зшивання фрагментів ДНК, які містять потрібні гени, здійснюють двома основними методами:

1. Зшиванням генів (фрагментів) ДНК за „липкими” кінцями, які є взаємокомплементарними ділянками, довжиною у 4–6 пар нуклеотидів, здійснюється ферментом ДНК-лігазою з утворенням ковалентного фосфодієфірного зв'язку між сусідніми нуклеотидами.

2. Зшиванням генів (фрагментів) ДНК за допомогою штучно побудованих „липких” кінців. За відсутності комплементарних „липких” кінців у фрагментів їх побудовують, тобто штучно синтезують ферментативним шляхом. Для цієї мети застосовують так звані лінкери (або „перехідники”), тобто короткі ділянки ДНК, які мають різні „липкі” кінці. Лінкерні фрагменти забезпечують об'єднання генів, зумовлюють їхню експресію, тому в середину лінкера вміщують регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку зв'язування з рибосомою.

Можливе зшивання фрагментів і за тупими кінцями, коли кінці фрагментів двонитіві. У цьому випадку реакція лігування має біохімічні особливості та її ефективність нижче,

ніж при зшиванні за „липким” кінцями.

Після того, як рекомбінантна ДНК зшита, її вводять у живі клітини. Але оскільки вона не здатна до самовідтворення, її руйнують внутрішньоклітинні нуклеази. Для того, щоб рекомбінантна ДНК стала частиною генетичного апарату клітини, вона повинна вбудуватися (інтегрувати) у її геном і реплікувати за його рахунок або бути здатною до автономної реплікації.

Молекули ДНК, які здатні акцептувати сторонню ДНК і автономно реплікувати, мають назву векторних молекул. До числа векторів належать плазмідні, бактеріофаги, віруси тварин. Вектори повинні мати такі особливості:

1. Уміщувати субстратні ділянки для певних ендонуклеаз рестрикції.
2. Мати властивості реплікону.
3. Уміщувати один або кілька маркерних генів, які після проникнення вектора у клітину зумовлюють її фенотип, що свідчить про наявність вектора.

Так, усі вектори забезпечують реплікацію вбудованих генів, їх експресію, інтеграцію в хромосому клітини тощо. Частіше в генетичній інженерії як векторів використовують плазмідні. Плазмідні – це бактеріальні реплікони (позахромосомні елементи спадковості), які успадковуються стабільно й містять собою дволанцюгові кільцеві молекули ДНК з розміром 1–3% геному бактеріальної клітини. Плазмідні поділяють на кон’югативні, які самі можуть переноситися в реципієнтну клітину за допомогою кон’югації і некон’югативні, що не мають цієї властивості. Кількість плазмід у клітині може коливатися від однієї до більше, ніж сто. Чим більша плазміда, тим менша кількість її копій знаходиться у клітині.

Плазмідні вектори сьогодні надзвичайно різноманітні за рахунок:

- зменшення розмірів плазмідні внаслідок вилучення ділянок, не обов’язкових для реплікації (чим більше плазміда містить унікальних ділянок упізнання для рестриктаз, тим вона має більш універсальні властивості);
- гібридизації векторів одного роду з іншими векторами



або природними плазмідами. При цьому знову сконструйована рекомбінантна ДНК повинна зберегати реплікаційні властивості вихідної плазміди;

- використання нових плазмід;
- застосування транспозонів;
- створення векторів з генетичними маркерами, які дозволяють вести відбір рекомбінантних клонів.

Еукаріотичні віруси використовують як вектори дещо менше. Практично використовують тільки онкогенний вірус SV 40 і його похідні. Усі ці вектори є дефектними вірусами, які не здатні давати повноцінні вірусні частинки в клітині господаря. З фагів, найчастіше як вектори, застосовують сконструйовані похідні фага X і фагів M13 і fd. У векторах на основі бактеріофага X використовується його особливість, яка полягає в тому, що більша частина його ДНК не бере участь у репродукції фага в клітині. Це дозволяє уводити сторонню ДНК у ДНК фага X як вектор.

Векторні плазміди і векторні віруси з вбудованими чужорідними генами часто називають гібридними (або химерними) плазмідами (або фагами).

Після конструювання рекомбінантну ДНК за допомогою трансформації вводять у реципієнтний організм: бактеріальну, грибку, рослинну або тваринну клітину. Трансформація передбачає попередню обробку клітин сполуками, які зумовлюють проникнення ДНК усередину клітини з подальшим їх перенесенням у середовище, де здатні існувати тільки клітини з векторними молекулами. Процес інфікування клітин за допомогою сторонньої ДНК, який приводить до утворення зрілого фагового потомства, має назву трансфекції.

Практично загальні способи трансформації та трансфекції засновані на тому, що при обробці клітин бактерій  $CaCl_2$  їх мембрана стає проникною для ДНК. Проте ефективність проникнення екзогенної ДНК у клітину досить низька. Тому серед бактерій, які зазнали трансформації, тільки невелика кількість виявляється трансформованою. Відділення їх від загальної маси здійснюється у процесі клонування. Для клонування бактеріальну суспензію певної концентрації

наносять на тверде поживне середовище. Бактеріальна клітина на поверхні агару починає ділитися з утворенням невеликої колонії. Ця колонія має назву клону, причому з кожної клітини утворюється свій клон, усі клітини якого мають властивості бактерії-родоначальника.

Рекомбінантні клони можуть бути ідентифіковані за продуктами, які вони синтезують. Але частіше доводиться ідентифікувати безпосередньо нуклеотидну вставку з використанням методів гібридизації. З цією метою бактеріальні колонії вирощують на нітроцелюлозних фільтрах, які вміщені на чашку Петрі з живильним середовищем. Далі готують репліки – до фільтра з вихідними колоніями притискають свіжий нітроцелюлозний фільтр, який потім переносять на чашку Петрі з щільним поживним середовищем, де утворюються колонії, ідентичні до перших. Потім фільтр-репліку піддають лужній обробці, при цьому клітини в колоніях лізуються і денатурована ДНК з клітин зв'язується з нітроцелюлозою у тій ділянці, де була розташована відповідна колонія.

Ефективність функціонування бактеріальних генів неоднакова, що зумовлено варіабельністю концентрації окремих білків залежно від їх функцій. Бактеріальні гени, які включені в геном, як правило, експресуються досить легко, даючи мРНК і білок у силу того, що в сигнальних послідовностях, що керують процесами транскрипції і трансляції у різних прокариотичних організмів, багато спільних рис. Що стосується експресії генів еукаріот у бактеріях, то вона здійснюється вкрай рідко, якщо не створювати спеціальні умови, оскільки регуляторні ділянки еукаріот відмінні від таких у бактерій. Регуляторні (сигнальні) ділянки не пізнаються бактеріальними РНК-полімеразами, що призводить до уповільнення транскрипції. При клонуванні геномної ДНК еукаріотичної клітини експресія генів не здійснюється через відсутність у бактерій системи сплайсингу. Отже, для експресії еукаріотичних генів у клітинах прокариотів необхідно, щоб ці гени знаходилися під контролем прокариотичних регуляторних елементів. У зв'язку з цим для здійснення експресії еукаріотичного гену відповідна ДНК, що кодує послідовність, у складі векторної молекули (наприклад,

плазміді) приєднується до регуляторних елементів бактерії-промотора, оператора й рибосом-зв'язуючої ділянки.

Таким чином, у сконструйованих проміжних рекомбінантних ДНК еукаріотичний ген буде перебувати під контролем бактеріальних регуляторних елементів. Доцільніше вбудовувати ген у відповідний вектор для експресії, який уже містить регуляторні елементи, що сприяють активній експресії вбудованого гена після введення рекомбінантної плазміді в бактеріальну клітину. Сумарна активність гена, який експресує, зростає зі зростанням числа копій рекомбінантної ДНК у розрахунку на клітину. Використовуючи багатокопійні плазміді, можна отримати надсинтез потрібних білкових продуктів. Отримання бактеріальних штамів-надпродуцентів плазмідних генів є одним з найважливіших завдань сучасної біотехнології в економічному, медичному та соціальному напрямах.

Сьогодні розроблено системи клонування в бактеріях, дріжджах, грибах, рослинах і ссавцях. Особливий інтерес з економічної точки зору містять системи клонування генів у грампозитивних бактеріях, багато з яких є надпродуцентами найважливіших хімічних сполук.

Вектори для клонування в таких системах становлять собою подвійні реплікони, здатні існувати й у клітині-донорі плазміді, і в тій клітині господаря, для якої вони призначені. Для цього створюють гібридні вектори, що містять реплікони з плазмід і необхідний реплікон з бактерії, дріжджів тощо, і спочатку клонують з подальшим відбором необхідних генів у добре вивченій системі. Потім виділені рекомбінантні плазміді вводять у новий організм. Такі вектори повинні містити ген (або гени), що надає клітині-господарю легко тестовану ознаку.

Серед дріжджів найбільш повно вивчений вид *S. cerevisiae*. Більшість штамів дріжджів містять автономно реплікуючу кільцеву ДНК. Робота з дріжджами полегшується тим, що подібно до бактерій, вони можуть рости в рідкому середовищі й давати колонії на твердому середовищі, а такі мають порівняно короткий час регенерації.

Проблема введення генів у клітини ссавців дуже важлива

для дослідження функціонування генів вищих еукаріот. Попередньо клоновані гени вводять у клітину тварин різними шляхами. Сутність одного з них полягає у трансформації клітин потрібним геном, сполученим з одним з генів, для яких здійснюється селекція. Для ідентифікації і розмноження клітин, що містять інтегровану ДНК, розроблено метод-маркери. Селективні маркери дають можливість уводити в клітини ссавців будь який ген, попередньо дотований з клонованим селективним маркером.

В останні роки сконструйовано велику кількість так званих човникових векторів і їх рекомбінантних похідних, які здатні до реплікації у тваринних, бактеріальних клітинах, що експресують клонований ген у тваринній клітині. Одне з найважливіших завдань генної інженерії – розробка технологій зі створення векторів, які подібні плазміді, не вбивають клітин-господаря й ефективно експресують клонований ген у тваринній клітині.

Становлять важливий інтерес мікроін'єкції ДНК безпосередньо в ядро клітини. Трансформація соматичних клітин ссавців відкриває можливість для вивчення механізмів регуляції експресії генів і цілеспрямованого модифікування генетичного апарату клітини тварин, людини. Культури клітин ссавців можуть стати ефективним джерелом виділення низкивірусних антигенів з метою отримання тиннеобхідних вакцин.

Сьогодні вже дещо розроблено способи введення генів у ембріональні клітини ссавців, мух та окремих рослин з метою зміни властивостей організму – швидкість росту, стійкість до захворювань, впливу зовнішніх факторів. З'ясовано, що рівень експресії стороннього гену залежить від місця інтеграції ДНК з хромосомами, від диференцювання тканин.

Незважаючи на певні успіхи в галузі інтеграції сторонніх генів у ембріональні клітини тварин, до цих пір не вдалося вбудувати сторонню ДНК у задану ділянку хромосоми, витіснити ген і замінити його новою нуклеотидною послідовністю, підпонижкувати новий ген системі регуляції організму. Подолання цих труднощів дозволить успішно

здійснювати генотерапію людини, а саме: лікування кількох десятків генетичних захворювань, які зумовлені відсутністю чи дефектами генів.

**3. Використання генетичної інженерії.** Перспективою використання генетичної інженерії є зміна низки властивостей, важливих для людини, організмів, а саме:

- підвищення продуктивності організмів;
- підвищення резистентності організмів до захворювань;
- збільшення швидкості росту організмів;
- поліпшення якості продукції.

Організми, що містять у своєму геномі рекомбінантний (сторонній ген), називають трансгенними, а інтегрований ген – трансгеном. Продукт цього гену (білок) має назву трансгенного.

Перспективним є отримання трансгенних тварин, яке містить низку етапів:

- 1) приготування розчину ДНК для мікроін'єкції;
- 2) витяг ембріонів з організмів-донорів;
- 3) мікроін'єкція ДНК і пересадка ін'єкованих ембріонів у яйцевід, або після культивування в матку синхронізованих реципієнтів;
- 4) у нащадків, що народилися досліджують експресію трансгена на рівні транскрипції і трансляції.

Трансгенне потомство отримують шляхом використання традиційних методів розведення тварин.

Для трансформації генів у геном тварин використовують такі прийоми:

- мікроін'єкція ДНК у пронуклеус зигот або у бластомер двоклітинного ембріона (найбільш поширений прийом);
- уведення ДНК за допомогою вірусних векторів;
- отримання трансгенних химер з генетично трансформованих клітин та ембріонів.

Мікроін'єкції ДНК здійснюють піпеткою діаметром 1 мкм, потім ембріони культивують до пересадки й переносять одночасно 20–30 ін'єкованих зигот у яйцеводи (хірургічним шляхом). Здійснюють аналізи на доказ інтеграції та експресії ДНК у трансгенних тварин, виділяючи РНК з тканин, аналізом

екзогенних білків. Організми, які народилися, можуть бути:

- трансгенні;
- мозаїки (походять з однієї зиготи, але мають різні генотипи, вони складають 30% від потомства); частина мозаїк не дає початок трансгенним лініям і не передає трансгени за спадщиною.

Завданнями сільськогосподарської біотехнології тваринництва є:

1. Створення тварин – біореакторів, які є продуцентами цінних біологічно активних речовин. Так, отриманий гормон росту підвищує надої на 23–31% при дозі 13 мг на день, інші форми препарату можна використовувати один раз на тиждень. Уведення гормону росту молодняку збільшує добові прирости на 20-30% при скороченні витрат кормів. При введенні цього ж гормону окремим тваринам здійснюється підвищення вмісту білка і зменшення жиру в тканинах.

2. Виділення трансгенних тварин, стійких до захворювань. Має велике значення у тваринництві, поки результати незначні, але обнадійливі. Так, створені популяції скота з домішкою крові інших тварин, стійких до кровепаразитних захворювань, з властивостями стійкості. Установлено, що захисні механізми від інфекційних захворювань зумовлені перешкодою проникненню збудника або зміною рецепторів. У мишей виявлено ген (Mx) резистентності до грипу А, який у модифікаційній формі наявний у всіх ссавців. Цей ген виділено, клоновано та використовують для одержання трансгенних свиней, але стійкість їх до вірусу грипу А доки не доведено. У культурі клітин з нирок трансгенних кроликів отримують трансгенну РНК, яка резистентна до аденовірусу H5. Ведуться роботи з отримання трансгенних тварин, стійких до маститу, за рахунок підвищення вмісту білка лактоферину в їх молочній залозі.

3. Отримання біологічно активних сполук за рахунок включення в клітини організму генів, що викликають у них синтез нових білків. Так, трансгенні тварини мають переваги перед мікроорганізмами та клітинними системами. Нові білки, які одержують у лініях трансгенних тварин, можуть бути

модифікованими й можуть спрямовано експресувати в клітини молочної залози і виходити з молоком. З молока трансгенних тварин витягають такі рекомбінантні білки (на стадії розробки або виробництва):

- людський білок С;
- антигемофільний факто ІХ;
- L-1-антитрипсин (одержують);
- лактоферин;
- урокіназу;
- хімосин (одержують);
- інтерлейкін-2.

В Единбурзі, у 1992 році виведено трансгенних овець з геном L-1 – антитрипсину людини та  $\beta$ -глобуліном. Вміст їх у молоці складає від 1 до 35 г/л, що відповідає половині всіх білків у молоці. Так, отримують 10 кг трансгенного білка від однієї тварини за рік, а цього достатньо для лікування 50 хворих при лікуванні емфіземи легенів. У культурі клітин вихід рекомбінантних білків становить приблизно 200 мг/л, а в трансгенних тварин може доходити до 1 літра.

За допомогою методів генетичної інженерії сьогодні одержують інсулін. Інсулін – це гормон підшлункової залози, що регулює водний обмін і підтримує нормальний рівень цукру в крові. Зниження його синтезу призводить до цукрового діабету. Інсулін – це глобулярний білок, який містить 51 амінокислотний залишок, складається з двох поліпептидних ланцюгів, зв'язаних двома дисульфідними містками. Синтезується він з одностороннього попередника – проінсуліну. Для лікування найважчої форми діабету (інсулінозалежного діабету) використовують препарат інсулін. Його отримують екстракцією гормону з підшлункової залози ВРС та свиней, яка надходить з м'ясної промисловості, так:

**100 г інсуліну (крісталичного) отримують при переробці 800–1000 кг вихідної сировини.**

В 1980 році датські вчені здійснили перетворення інсуліну свиней на інсулін людини.

У 1978 році у США був отриманий штам *E. coli*, який продукував щурячий проінсулін. У цьому ж році були синтезовані окремі ланцюги людського інсуліну за допомогою експресії їх синтетичних генів у клітини *E. coli*. Клітини *E. coli*, трансформовані такими рекомбінантними плазмідами, виробляли гібридні (хімерні) білки, які склалися з фрагмента в-галактозидази і А або В пептиду інсуліну, який був приєднаний до неї через залишок метіоніну. При обробці хімерного білка бромціаном пептид звільнявся. Однак замикання дисульфідних містків між ланцюгами інсуліну здійснювалося важко.

У 1981 році синтезований ген-аналог проінсуліну, тобто міні-С-проінсулін.

У 1980 році У. Гілберт зі співробітниками виділили мРНК інсуліну з пухлини р-клітин підшлункової залози щура і за допомогою зворотної транскриптази отримали з неї ДНК. Отриману ДНК вбудували в плазмиду *E. coli*. Рекомбінантна плазида містила інформацію про структуру проінсуліну. У результаті трансляції мРНК у клітинах синтезувався гібридний білок, що містить послідовності проінсуліну, який виділяли з такого білка.

За генно-інженерними методами одержують й соматотропін. Соматотропін – це гормон росту людини, який секретується передньою часткою гіпофіза, складається з 191-амінного залишку. Уперше виділено та очищено соматотропін в 1963 році. Зазвичай отримують його з гіпофізу трупів (Швеція, Італія, Швейцарія, США), але ця кількість недостатня (усього третина від потрібного). Препарат з трупного матеріалу містить суміш кількох форм, тому при лікуванні у хворих виробляються антитіла, ефективність знижується. Сьогодні соматотропін отримують методом генної інженерії у спеціально сконструйованих бактеріальних клітинах (*E. coli*). Цей гормон містить додатковий залишок метіоніну, що підвищує біологічну активність. Вперше його біосинтез здійснено в 1979 році:

- спочатку клонували дволанцюгову ДНК;
- шляхом розщеплення отримали послідовність, що кодує амінокислотний понизкуок гормону за винятком перших



23 амінокислот, окремо виділили фрагмент, який кодує перші 23 амінокислоти;

- об'єднали два фрагменти і підставили до ділянки зв'язування рибосом;

- кінцевий вихід гормону складав 2,4 мкг на 1 мл культури (100000 молекул гормону на клітину), і містив додатковий залишок метіоніну.

Бактеріальний саматотропін почали отримувати з 1984 року, компанією „Генетек” Сан-Франциско. Це виробництво ґрунтувалося на даних одержання його у клітинах *E. coli*, які були розроблені в Інституті Пастера (Париж) та в Інституті молекулярної біології (Москва) у 1982 році. Сьогодні велике значення має виділення і синтез поліпептиду-гіпоталамічного рилізінг-фактору соматотропіну.

Генно-інженерні методи широко використовують і в рослинництві для:

- створення нових генотипів рослин;
- цілеспрямованої зміни генотипів рослин;
- перспективного введення в геноми генів стійкості до стресових факторів, фітопатогенів, а також генів скоростиглості, здатності до симбіотичної фіксації азоту.

Сутність генетичної трансформації полягає у перенесенні чужорідних модифікаційних генів в еукаріотичні клітини. Отримання рослин, з новими здібностями, із трансформованих клітин (регенерація) можлива завдяки властивості клітини до тотіпотентності (здатності розвиватися в цілу рослину). Обмеження можливостей генетичної інженерії рослин пов'язано з:

- меншою вивченістю геному рослин, що ускладнює виділення окремих генів;

- неможливістю підібрати для всіх рослин, умови регенерації (сьогодні отримують рослини-регенерати з протопластів картоплі, люцерни, моркви, тютюну, капусти тощо);

- важкістю підбирання вектора для введення ДНК (запропоновано використовувати, як векто, пилко).

Отримання трансгенних рослин уміщує перенесення

генів у рослинні клітини завдяки специфічних структур – векторів. Більш поширені вектори на основі Ті-плазміди.

Ті-плазміди – природні вектори, які мають всі необхідні властивості для перенесення, стабільного включення, експресії в рослинах, мають широке коло господарів. У бактеріальних клітинах реплікують автономно.

У рослинах викликають утворення пухлин – корончатих галів (вражає дводольні), притаманні роду Агробактерій. Після зараження частина Ті-плазміди вбудовується в хромосоми клітин рослини-господаря. Ділянка Ті-плазміди, яка вбудована в хромосому клітин рослин, має назву Т-галузі в бактерії, і Т-ДНК у клітині рослин. Ця область містить приблизно 10% Ті-плазміди. Гени, що відповідають за перенесення та інтеграцію генів Т-області, знаходяться не в ній самій, а поруч – в області вірулентності (vir-галузі). Недолік цих плазмід полягає у тому, що:

- окремі гени, що знаходяться у Т-ДНК, змушують рости клітини рослин незалежно від гормонів, унесених у поживне середовище;

- Ті-плазміди мають великі розміри, що заважає їх убудуванню; зараз використовують похідні Ті-плазмід, у яких залишають Т-область, а замість структурних генів ушивають такі, що переносяться.

Крім Ті-плазмід використовуються Rі-плазміди, які є більш перспективними.

Проміжні й бінарні вектори конструюють на основі Ті-плазмід.

Проміжний вектор отримують так:

- спочатку Т-область за допомогою рестриктаз вирізають з плазміди;

- вставляють у вектор для клонування у клітці *E. coli* і розмножують;

- отриману рекомбінантну плазмиду вводять в клітини Агробактерії, що несе повну Ті-плазмиду;

- при подвійному кросинговері між гомологічними ділянками Т-область рекомбінантної плазміди, яка містить чужорідний ген, включаються в Ті-плазміди замість нормальної

галузі;

– заражають матеріал бактеріями з Ті-плазмідною, у яку вбудовано ген рослини.

Бінарні вектори – це бактерії, які містять дві різні Ті-плазмідні. Одна з них несе *vir*-область і забезпечує інтеграцію у геном рослин клітини Т-галузі, що містить будь-які гени іншої плазміді. У цьому випадку подвійного кросинговеру не потрібно. Однак, отримані в результаті зараження бактеріями рослинні клітини не здатні до регенерації через придушення диференціювання. Цього уникають шляхом уведення генів, що блокуючих диференціювання або вирізанням їх з Т-ДНК.

Як вектор використовують і ДНК-вмісні віруси рослин. Переважна більшість вірусів рослин належать до РНК-геномних, й тільки 1–2% вірусів містять ДНК як геном. Вони можуть бути:

– одноланцюговими (вірус золотистої мозаїки квасолі, вірус смугастості кукурудзи);

– дволанцюгові (вірус мозаїки кольорової капусти). До переваг фітовірусів належать те, що:

– реплікація фітовірусів здійснюється з утворенням великої кількості копій  $10^6$ – $10^7$  штук (хороша експресія стороннього гену);

– мають малий розмір геному (легкість маніпулювання ДНК).

До недоліків належить:

– невелика ємність, яку збільшують шляхом інфікування протопластів;

– окремі нездатні вбудовуватися в хромосоми господаря (видаляють цей недолік прийомом – агроінфекції геном вірусу вбудовується у Т-область Ті-плазміді й за її допомогою інтегрується у геном рослини).

Існують і методи прямого перенесення генів у рослину. Ці методи виникли для використання в ізольованих протопластах, їх багато, до них належить:

– трансформація рослинних протопластів, (використовується будь-який ДНК-вектор, донорна ДНК може, не містити специфічних біологічних сигналів (*vir*-областей);

здійснюється завдяки коловій преципітації ДНК і злиття протопластів;

- зараження агробактеріями, які використовують як вектори, культури протопластів, на початковій стадії її зростання;

- мікроін'єкції ДНК, які проводять аналогічно до методу мікроін'єкцій тваринних клітин; цей метод найбільш універсальний, ефективність трансформації складає 10–20%, трансформація невідоспецифічна, тобто перенесення генів може здійснюватися у будь-яку рослину;

- електропорація – ґрунтується на підвищенні проникності біомембран за рахунок дії імпульсів підвищеної напруги, при цьому молекули ДНК проникають через пори в клітинній мембрані;

- упаковка в ліпосоми – цей метод дозволяє захистити екзогенний генетичний матеріал від руйнування нуклеазами рослинної клітини; ліпосоми – це сферичні тільця з фосфоліпідними оболонками.

Метод біологічної балістики – один з найефективніших методів трансформації однодольних рослин. Вихідним матеріалом для трансформацій є суспензійна культура, калусна тканина, 4–5 денні незрілі зародки однодольних. Метод заснований на напиленні ДНК-вектора на найдрібніші частинки вольфраму, якими бомбардують клітини за допомогою біолістичної пушки за рахунок перепаду тиску. Клітини, що вижили, культивують і використовують для регенерації рослин.

Методи генетичної інженерії використовують у рослинництві:

1. Для поліпшення амінопептидного складу запасних білків рослин. Підвищення кількості запасних білків підвищує харчову та технологічну цінність рослин. Так, більшість власних запасних білків рослин незбалансовані для харчування людини, тварин. Запасні білки злаків – проламіни – бідні на лізин, триптофан, тріонін. Селекція не дає результатів, бо здійснюється кореляція з іншими необхідними речовинами.

Генно-інженерні методи є перспективними для створення нових сортів. До етапів отримання трансгенних

рослин з поліпшеним амінокислотним складом білка належить:

- клонування генів запасних білків;
- вивчення механізмів тканино специфічної таї тимчасової експресії білків, виявлення послідовностей ДНК, що визначають цей механізм;
- цілеспрямована зміна послідовностей генів запасних білків для поліпшення амінокислотного складу;
- створення векторів, що містять змінений ген;
- упродовження модифікаційних генів у рослини.

Так, уведення в геном пшениці модифікаційного гену проламіни привело до поліпшення запасу поживних речовин, поліпшенню хлібопекарських якостей борошна.

2. Підвищення ефективності процесу фотосинтезу полягає в клонуванні хлоропластних генів у клітинах бактерій і їх перенесенні в рослини, що пов'язано з подібністю клітин прокариотів і хлоропластів.

У наш час клоновано кілька хлоропластних генів: АТФ-синтетази, цитохроми, ген синтезу субодиниць РБФ-карбокситази.

3. Вирішення проблеми засвоєння азоту. Азотофіксації – може здійснюватися за участю таких видів азотфіксації: симбіотичної, асоціативної, вільної.

За допомогою техніки рекомбінації ДНК були складені генетичні карти генів азотофіксації (nit-гени). Вони розташовуються між генами, що кодують біосинтез гістидину (his) і генами, що відповідають за засвоєння шікімової кислоти. У клітинах бактерій-симбіонтів плазмиди містять ще гени, які відповідають за розвиток бульбочок. Конструкція nit-плазмід дозволяє передавати здатність до азотофіксації організму, який не володіє цими властивостями. Велике значення при цьому має перенесення цих генів у рослини, але тут виникає низка труднощів, наприклад, руйнування нітрогенази під впливом кисню.

4. Підвищення стійкості рослин до фітопатогенів. Захист рослини в цьому напрямкі ґрунтується на:

- синтезі сполук, які викликають загибель патогенів (білки PRP – ферменти хітинази,  $\beta$ -1,3-глюконази, вони

руйнують клітинні стінки клітин бактерій, грибів);

– сворення структурних бар'єрів, що перешкоджають поширенню інфекції (лігніфікація клітинних стінок інфікованих мікроорганізмами, наявність у клітинній стінці білків-екстенсинів і олігосахаридів).

Генна інженерія в цьому напрямкі пропонує:

– уведення в геном рослин генів, що відповідають за синтез хітинази й т. ін. (так, до рослини томатів уведено ген захисних пептидів редьки);

– уведення в геном рослин гену оболонки вірусу, що призводить до інгібування і зниження інфікованості, так отримано стійкий антивірус, ефективний у тютюну;

– уведення й експресія генів антивірусних антитіл так, уведення гену людського інтерферону за допомогою вірусу табачної мозаїки в геном тютюну, картоплі забезпечує стійкість до вірусних захворювань.

5. Створення або підвищення стійкості рослин до гербіцидів.

Гербіциди широкого спектра дії можуть знищувати бур'яни та пригнічувати культурні рослини, у зв'язку з цим одержання стійких до гербіцидів культурних рослин є дуже важливим для рослинництва. Це може досягатися двома підходами:

– прямою селекцією стійких до гербіцидів мутантних форм рослин;

– уведенням до геному рослин генів гербіцид-резистентності рослинного або бактеріального походження.

Основою створення таких трансгенних рослин є:

– виявлення мішеней дії гербіцидів у клітині рослин;

– відбір рослин, стійких до цього гербіциду, які можуть бути джерелом генів резистентності;

– ідентифікація і клонування цих генів;

– вивчення їх експресії для використання в трансгенних конструкціях.

Завдяки використанню методів генетичної інженерії створено стійкі до гербіцидів (імідазол, бромоксілін, атразин) сільськогосподарські культури шляхом уведення мутантних

генів, що підтримують синтез ферментів на які гербіциди не діють. Але в тканинах цих рослин гербіциди накопичуються, тому їх використовують лише з технічною метою.

6. Стійкість рослин до комах. Отримання трансгенних рослин, стійких до комах, стало можливим після того, як було виявлено, що бактерії р. *Vacillus* синтезують специфічний білок – прототоксин. Цей білок потрапляє в кишечник комахи й перетворюється в активну форму токсину. Ген, що відповідає за експресію прототоксину, виділено та введено в геном тютюну, томата й отримано трансгенні рослини, які неушкоджені комахами.

7. Підвищення стійкості до абіотичних стресів. Стійкість до абіотичних стресів забезпечується трьома способами:

- за допомогою фізіологічних механізмів, що дозволяють рослинам уникнути несприятливих впливів (наприклад, існування періоду спокою);

- адаптацією завдяки морфологічним пристосуванням (товста кутикула, зменшення листової пластинки);

- зміною метаболізму (найбільш доступний спосіб).

Стрессова відповідь у бактерій і вищих рослин виражається однаково, а саме: розпочинається посилений синтез молекул осмопротекторів, які стабілізують осмотичний баланс, стабілізують білкові молекули. Так, при водному стресі змінюється метаболізм і накопичуються осмопротектори пролін, гліцинбіотін.

Для отримання стійких рослин здійснюють:

- клонування генів, що кодують необхідні ферменти;

- одержання векторних конструкцій на основі Ті-плазмід;

- уведення їх у рослини.

Адаптація до низьких температур заснована на накопиченні в клітинах розчинених речовин, що знижують можливість утворення великих кристалів льоду. Крім того, синтезується велика кількість білків з сульфгідрильними групами, які мають високу гідратацію (гідратована вода практично не замерзає). Центром замерзання рослин є білки –

бактерії епіфітної мікрофлори, якщо їх знищити стрептоміцином, то рослини не замерзають при температурі  $-8^{\circ}\text{C}$ . Але стрептоміцин дорогий та шкідливий, тому легше змінити генوم рослин. Уведення ж мутантного штаму може призвести до витіснення природного, який, потрапляючи в атмосферу сприяє кристалізації атмосферної вологи.

### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Дайте визначення поняття рекомбінантна ДНК. Перерахуйте та схарактеризуйте найбільш важливі методи одержання рекомбінантних ДНК.

2. Схарактеризуйте системи перенесення рекомбінантних молекул у клітини.

3. Дайте визначення поняття вектор. Визначте переваги та недоліки різних форм векторів.

4. Схарактеризуйте, визначивши пріоритети, різні методи штучного перенесення генетичного матеріалу.

5. Вкажіть напрями використання цих методів при одержанні різних рекомбінантних клітин. Визначте загальні особливості клонування ідентифікації та експресії клонованих генів. Схарактеризуйте процес клонування у клітинах грампозитивних бактерій, дріжджів, тварин.

6. Схарактеризуйте особливості процесу одержання соматотропіну за допомогою методів генетичної інженерії.

7. Перерахуйте особливості одержання трансгенних рослин з необхідними властивостями і визначте основні методи для цього.

8. Схарактеризуйте основні напрями використання генно-інженерних методів у рослинництві.

9. Визначте особливості одержання трансгенних тварин з необхідними властивостями та основні методи для цього. Які заборони існують при реалізації цього напрямку та можливі негативні наслідки.

10. Наведіть приклади високопродуктивних трансгенних клітинних штамів, які одержують сьогодні.



### Література:

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса . – М. : Мир, 1988 . – 479 с.
2. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.
3. Сазыкин Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Изд. центр „Академія”, 2007. – 256 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
5. Биотехнология и ее перспективы / И. В. Березин, А. К. Яцимирский. – М. : Знание, 1986 . – 64 с.
6. Биотехнология растений : культура клеток / Г. П. Болвелл, К. Р. Вуд, Р. А. Гонзалес. – М. : Агропромиздат, 1989. – 279 с.

## **Тема № 7: ОСНОВИ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

**Мета:** вивчити поняття культура клітин та тканин, особливості культивування об'єктів у культурі *in vitro*, основні вимоги до лабораторії, де вирощують культури *in vitro*. Схарактеризуйте методи стерилізації, підбору поживних середовищ та умов культивування. Дайте характеристику наявних класифікацій культур клітин та тканин за різними ознаками.

### **1. Історія одержання культури клітин і тканин.**

**2. Методи та умови культивування культури клітин і тканин.**

### **3. Типи культур клітин та тканин.**

#### **1. Історія одержання культури клітин і тканин.**

Клітинна інженерія – один з найбільш важливих напрямів у біотехнології, який базується на використанні ізольованої культури клітин або тканин еукаріотичних організмів та тотіпотентності рослинних клітин.

Бурхливий розвиток клітинної інженерії приходить на 50-ті роки ХХ ст., але перші попити вирощування ізольованих шматочків тканини були здійснені набагато раніше. Так, наприкінці ХІХ – початку ХХ ст. німецькі вчені Х. Фехтінг (1892), С. Рехінгер (1893), Дж. Хаберландт (1902) уперше невдало стимулювали ріст рослинних тканин та органів, які були вміщені на фільтрувальний папір з сахарозою.

Перші позитивні результати були одержані в 1922 році американським ученим В. Роббінсом та німецьким ученим В. Котте, незалежно один від одного вони виростили меристеми кінцівок коренів томатів та кукурудзи на синтетичному поживному середовищі.

Становлення та розвиток методу культури тканин і клітин вищих рослин розпочався в 1932 році з робіт французького вченого Р. Готре й американського дослідника Ф. Уайта. Вони показали, що при періодичній пересадці на свіже поживне середовище кінцівки кореня можуть рости довго, і

розробили методи культивування окремих нових об'єктів. З цієї миті розпочинається масове розроблення нових поживних середовищ для культивування культур тканин і клітин. У 1959 році у стерильній культурі вирощувалося вже 142 види вищих рослин.

У 1955 році після відкриття Ф. Скугом і С. Мілером нової групи фітогормонів – цитокинінів, установили, що при спільній їх дії з ауксинами вілбувається стимулювання поділу клітин, підтримується ріст калусної тканини, індукується морфогенез у визначених умовах.

У 1959 році було запропоновано метод вирощування великих обсягів клітинних суспензій. Важливою подією стала розробка в 1960 році Е. Коккінгом методу одержання ізольованих протопластів. Це дало можливість одержати соматичні гібриди, ввести в протопласти вірусні РНК, клітинні органели тощо. У цей же період Дж. Морел та Р.Г. Бутенка запропонували метод клонального мікророзмноження. У 1969 році в СРСР під керівництвом Р.Г. Бутенка було розроблено метод культивування ізольованих тканин та клітин за допомогою тканин – „няньок”. В останні роки великі успіхи досягнуто в розробці методів одержання трансгенних рослин, технологій використання ізольованих тканин і клітин трав'янистих рослин, почато культивування тканин дерев'янистих рослин.

**2. Методи та умови культивування культури клітин і тканин.** Вирощування ізольованих клітин і тканин на штучних поживних середовищах у стерильних умовах (*in vitro*) одержало назву методу культури ізольованих тканин. Існують загальні вимоги до вирощування об'єктів у культурі *in vitro* незалежно від їх таксономічної групи. До таких вимог, насамперед, належить витримування правил асептики та створення необхідних умов культивування (склад поживного середовища, вплив факторів зовнішнього середовища).

При культивуванні фрагментів тканин, органів-експлантів, окремих клітин необхідно витримувати вимоги повної асептики. Сторонні мікроорганізми, які можуть

потрапити в поживне середовище, виділяють сторонні речовини-токсини, інгібують ріст клітин і призводять до загибелі культури. Тому при роботі з культурами *in vitro* дотримують правил асептики, виконуючи роботи в ламінар-боксі (де подається стерильне повітря) або в асептичних кімнатах (повітря обробляється ультрафіолетовими лампами). Робочу поверхню в ламінар-боксі та асептичних кімнатах, усі інструменти перед роботою додатково стерилізують спиртом, працюють обов'язково в стерильному одязі.

Чистий посуд, інструменти загортають у папір або у фольгу й стерилізують сухим жаром у сушильній шафі при температурі 160<sup>0</sup>С і підвищеному тиску протягом 15–20 хвилин. Якщо до складу поживних середовищ належать речовини, які розкладаються при автоклавованні, їх стерилізують шляхом фільтрації через бактеріальний фільтр. Потім профільтовані компоненти додають до проавтоклавованого середовища, яке охолоджено до температури 40<sup>0</sup>С.

Рослинні тканини піддають поверхневій стерилізації. Спочатку частину рослини, з якої виділяють експлант, промивають водою з милом й ополіскують чистою водою. Потім рослинний матеріал стерилізують у розчинах дезінфікуючих речовин. Час стерилізації та вид, концентрація дезінфікуючої речовини залежить від об'єкта.

Після витримування експлантів у дезінфікуючому розчині їх кілька разів промивають у дистильованій воді й ланцетом видаляють поверхневий шар клітин та зрізах експлантів, тому що ці клітини можуть бути пошкодженими. Інколи, при інфікуванні всередині рослинної тканини окрім поверхневої стерилізації використовують антибіотики. Але цей засіб не завжди приводить до стерилізації, тому що важко вобрати точно діючий антибіотик.

Велике значення при культивуванні мають поживні середовища. Ізольовані клітини та тканини культивують на багатоскладних поживних середовищах. Вони можуть суттєво розрізнятися за складом. Але всі вони вмщують необхідні рослині макро- й мікроелементи, вуглеводи, вітаміни, фітогормони та їх синтетичні аналоги. Вуглеводи (сахароза або

глюкоза) належать до складу будь-якого поживного середовища в концентрації 2–3%. Більшість калусних тканин не мають хлорофілу, тому їх вирощують в умовах розсіяного освітлення або в темряві. Винятком є калусні тканини мандрагори, амаранту та окремих інших рослин.

Обов'язковими компонентами поживних середовищ повинні бути ауксини, які викликають дедиференціювання клітин експланту, та цитокініни, які індукують клітинний поділ. Зміна співвідношення цих або інших фітогормонів призводить до реалізації різних типів морфогенезу.

Високий вміст нітратів, іонів амонію, калію, фосфату викликає швидкий ріст клітин. У середовище можуть бути додані ендосперми незрілих зародків окремих рослин, пасока дерев, різні екстракти (солодовий, дріжджовий, томатний сік). Уведення їх у середовище стимулює поділ клітин.

При виготовленні твердих поживних середовищ для поверхневого вирощування калусних тканин використовують агар-агар.

Склад поживних середовищ, які використовують при культивуванні клітин та тканин, дуже різний. Найбільш універсальним вважають середовище Мурасіге та Скуга. Воно використовується для утворення калусів, підтримці неорганізованого калусного росту, індукції морфогенезу в більшості дводольних рослин.

Середовище Гамберга й Евелега підходить для культивування клітин та тканин бобових рослин і злаків, середовище Уайта забезпечує укорінення пагонів і нормального росту стебла після регенерації.

На ріст та розвиток рослинних тканин *in vitro* великий вплив здійснюють фізичні фактори – світло, температура, аерація, вологість.

Більшість калусних тканин можуть рости в умовах слабкого освітлення або в темряві. Але світло може поставити фактор, який забезпечує морфогенез й активізує процеси вторинного синтезу. Як джерело світла використовують люмінесцентні лампи. Для більшості трав'янистих рослин оптимум освітлення складає приблизно 1000 люкс. Низьке – 300

люкс або високе – 3000–1000 люкс освітлення пригнічує ріст. Освітлення може впливати на метаболізм калусних клітин.

Крім інтенсивності світла, на культуру впливає якість світла.

Для більшості калусних культур оптимальна температура культивування складає 26<sup>0</sup>С. На відміну від росту культур клітин та тканин індукція їх морфогенезу потребує більш низьких температур – 18–20<sup>0</sup>С. Вплив температури на метаболізм клітин *in vitro* вивчено слабо.

Для вирощування суспензійних культур велике значення має аерація. Особливо аерація важлива при вирощуванні клітин, які культивують у великих обсягах. При вирощуванні клітин у малих обсягах (колбах) нормальна аерація досягається при постійному перемішуванні суспензії, у великих обсягах – за рахунок подачі повітря знизу.

Оптимальна вологість у приміщенні, де культивують культури, повинна складати 60–70%.

Тому при введенні в культуру нового виду рослин необхідно ретельно вивчити вплив фізичних факторів на ріст та фізіологічні характеристики цієї культури.

**3. Типи культур клітин та тканин.** Залежно від засобу, умов культивування та походження можна виділити кілька типів культур клітин та тканин. Якщо культивування здійснюється поверхнево на агаризованому поживному середовищі, то утворюється калусна тканина. Вона не має чіткої структури, але може розрізнятися за щільністю. Рихла калусна тканина має надто обводнені клітини, легко розпадається на невеликі групи клітин та кластери й тому може бути використана для одержання суспензійної культури. Тканина середньої щільності характеризується добре вираженими мерестиматичними властивостями, у ній легко ініціюється процес органогенезу. У щільних калусних тканинах розрізняють зони редукованого камбію та трахеєподібних елементів.

Існує й суспензійна культура клітин, яку вирощують у рідкому поживному середовищі при глибинному культивуванні. Клітинні суспензії утворюють як з калусних тканин, так і

безпосередньо з експланту. Для одержання суспензійних культур краще використовувати калуси рихлого типу. Якщо для цього необхідно використовувати щільні калуси, то його можна розрихлити, виключивши з поживного середовища солі  $\text{Ca}^{2+}$ . Для цього ж можна культивувати тканини на середовищі, яке вміщує ауксин, 2,4-Д або ферменти – пектиназу (0,2 мг/л) та целюлазу (0,01 мг/л).

Суспензійні культури клітин можна одержувати й безпосередньо з експланту за методом Ф. Стюарда. Для цього експлант уміщують у рідке середовище при постійному автоматичному перемішуванні. Дедифференційовані клітини відриваються від експланту, утворюють суспензію в поживному середовищі при постійному стримуванні, тобто представлені різними агрегатами калусних клітин.

Клітинні суспензії відіграють важливу роль у біотехнології, тому що використовуються для одержання ізольованих протопластів, які є основою клітинної селекції при введенні сторонніх ДНК та інших процесах; для одержання вторинних метаболітів; виявлення нових речовин, вирощування клітинної біомаси.

Стан клітинної суспензії характеризується щільністю клітинної популяції – за 14–16 діб щільність підвищується від  $5 \times 10^4$  до  $5 \times 10^6$  кл/мл. Якість суспензії визначається ступенем утворення агрегатів, які не повинні вміщувати не більш ніж 10–12 клітин.

Велику увагу приділяють культурам одиночної клітини, які використовують у клітинній селекції для відбору гібридних клітин та їх клонування; для генетичних та фізіологічних досліджень.

Культивування однієї або кількох клітин має труднощі, які пов'язані з тим, що одинока клітина існує в умовах розтворених для калусних клітин, але не здатна до поділу. Тому для їх культивування вироблено спеціальні методи. Усі вони засновані на використанні так званого „кондиціюючого фактору” – уведення метаболітів, які виділяються в середовищі клітинами, які поділяються (при культивуванні кількох клітин їх не вистачає).

Для підвищення вмісту „кондиціюючого фактора” використовують такі методи:

1. Метод тканини- „няньки” – кондиціюючий фактор виділяється шматочками тканини- „няньки”, які знаходяться понизку з поодинокими клітинами.

2. Метод „годуючого шару” – кондиціюючий фактор виділяють клітини суспензійної культури тогожого виду рослин, які активно поділяються, як і поодинокі клітина.

3. Кондиціонування середовища – здійснюється шляхом додавання до нього поживного середовища, яке відфільтроване від клітин, що інтенсивно діляться.

4. Метод культивування поодиноких клітин здійснюється в мікрокраплі, тобто в дуже малому об’ємі ( $\approx 20$  мкл), де багатого поживного середовища.

Природа кондиціюючого фактора вивчена мало, але вважається, що він водорозчинний, термостабільний, містить низькомолекулярні речовини, не змінюється фітогормонами.

#### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Дайте визначення поняття культура клітин та тканин.

2. Визначте основні вимоги до культивування об’єктів у культурі *in vitro*.

3. Схарактеризуйте вимоги до лабораторії, де вирощують культури *in vitro*.

4. У чому полягає роль асептичних умов при одержанні культур клітин та тканин?

5. Назвіть та схарактеризуйте методи стерилізації матеріалів, обладнання, об’єктів, з яких відбирають експланти.

6. Установіть вплив фізичних факторів (аерації, світла, температури та інших) на культивування культур клітин та тканин.

7. Визначте основні вимоги до поживних середовищ, які використовують для культивування об’єктів у культурі *in vitro*.

8. Дайте характеристику поживним середовищам, які найбільш часто використовують при вирощуванні культур *in vitro*, наведіть приклади.

9. Схарактеризуйте типи культур клітин залежно від



способу та умов культивування (рихла, середньої щільності, щільна та суспензійна, культура поодиноких клітин).

10. Перерахуйте основні методи вирощування поодиноких клітин.

11. Вкажіть переваги та недоліки різних методів вирощування поодиноких клітин. Дайте визначення поняття кондиціюючий фактор.

### **Література:**

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988 . – 479 с.

2. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.

3. Калашникова Е. А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева. – М. : КолоС, 2006. – 144 с.

4. Катаева Н., Бутенко Р. Клональное микроразмножение растений / Н. Катаева, Р. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 238 с.

5. Мусієнко М. М. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин / М. М. Мусієнко, О.О. Панюта. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 46 с.

6. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е .А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.

## **Тема № 8: ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР КЛІТИН ТА ТКАНИН І ШЛЯХИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ**

**Мета:** визначити основні характеристики калусних клітин, особливості дедиференціювання як основи калусогенезу. Установити особливості морфогенезу, гістогенезу та органогенезу. Схарактеризувати використання методу ізольованих клітин і тканин у сучасних технологіях, одержанні штучних систем.

- 1. Загальна характеристика калусних клітин. Дедиференціювання як основа калусогенезу.**
- 2. Морфогенез, гістогенез, органогенез калусних тканин.**
- 3. Ізольовані протопласти, їх одержання та культивування. Використання методу культури клітин і тканин в утворенні сучасних технологій. Кріозбереження.**

**1. Загальна характеристика калусних клітин. Дедиференціювання як основа калусогенезу.** Калусна клітина має свій цикл розвитку, який є аналогічним циклу розвитку всіх інших клітин. Він уміщує: поділ, розтягнення, диференціювання, старіння та загибель. Диференціювання калусних клітин має назву вторинного. Але це не вторинне диференціювання на якому засновано морфогенез.

Ріст калусних тканин підпонижукований загальним закономірностям. Крива росту калусних тканин також має характер S-подібної кривої (ростова крива Сакса) і вміщує 5 фаз, тривалість яких неоднакова в різних видів рослин.

Перша фаза – латентна, лаг-фаза, уміщує підготовку клітин до поділу.

Друга фаза – експотенціальна (логарифмічна), лог-фаза. У цей час мітотична активність найбільша, ріст здійснюється з прискоренням, маса калуса збільшується.

Третя фаза – лінійна, характеризується постійною швидкістю росту калусної маси.

Четверта фаза – сповільненого росту, під час якої

інтенсивність поділу клітин різко знижується.

П'ята фаза – стаціонарна – маса калусу не збільшується, тому що починається загибель клітин.

Калусні клітини і тканини, які культивуємо, зберігають багато фізіологічних особливостей, що притаманні клітинам рослини, з якої вони були одержані. Наприклад, морозостійкість, стійкість до абіотичних факторів, здатність до синтезу вторинних метаболітів. Крім того, у калусних клітин є певні особливості, які належать тільки їм – фізіологічна асинхронність та генетична гетерогенність.

Фізіологічна асинхронність – найбільш важлива властивість нестатевої популяції клітин. Вона пов'язана з тим, що в кожний даний момент часу клітини знаходяться в різних фазах росту: одні поділяються, інші ростуть, треті старіють. Тому фізіологічний стан такої популяції прийнято оцінювати за станом більшості клітин.

До причин виникнення асинхронності належать:

1. Особливості виду, сорту, генотипу індивідуальної рослини, а також особливості експлантат.
2. Стреси культивування, наприклад неоптимальне для певного виду клітин середовище.
3. Зміна балансу ендогенних гормонів й концентрації в середовище гормонів протягом вирощування.
4. Генетична гетерогенність клітин і клонів.
5. Аномалія мітотичного циклу клітин *in vitro*.
6. Фізичні фактори (температура, світло, аерація).

Асинхронність – стійка властивість популяції калусних клітин. Якщо за допомогою специфічного впливу синхронізувати клітинну популяцію, то вже через 3–4 поділи вона знову стає асинхронною.

Генетична гетерогенність – властивість клітин соматичної популяції (нестабільність геному та їх генетична гетерогенність). Генетично стабільними вважають тільки клітини меристематичних тканин. У клітинах інших тканин при культивуванні можуть виникати поліплоїдія, анеуплоїдія, хромосомні аберації, генні мутації. Генетична гетерогенність – необхідна умова існування популяції клітин і слугує основою

для їх адаптації.

Причинами генетичної гетерогенності є:

1. Генетична гетерогенність вихідного матеріалу. У рослинах клітин характеризується різною плідністю, диплоїдні тільки меристематичні клітини, які активно поділяються.

2. Порушення корелятивних зв'язків при виділенні первинного експланта з рослини.

3. Дія компонентів середовища. Екзогенні гормони й стимулятори можуть здійснювати мутагенний вплив, ауксини-мутагени, цитокиніни – сприяють поліплоїдизації клітин.

4. Довге субкультивування, при якому накопичуються генетичні зміни калусних клітин.

Після 5–6 пересадок новий каріотип клітинної популяції, як правило, стабілізується, якщо умови культивування постійні. Генетична нестабільність калусних клітин має велике значення для селекційної роботи. Але генетична гетерогенність популяцій калусних клітин у культурі не впливає на збереження в їх геномі основних якостей виду та рослини-донора.

Хоча гормони і викликають мутації, калусні тканини більшості рослин утворюються тільки за наявності в поживному середовищі й ауксинів, і цитокинінів. Винятком є незрілі зародки пшениці й сім'ядолі соняшника. Перші утворюють калусну тканину на поживному середовищі з 2,4-D, але без цитокинінів. Другі, на середовищі з цитокинінами, але без ауксинів. Можливо ця специфіка пов'язана з ендогенним вмістом фітогормонів і з компетентністю клітин. Але при довгому культивуванні в усіх тканин може виникнути специфічна властивість гормоннезалежності, тобто автономності стосовно до ауксинів та цитокинінів.

Клітини, які в процесі культивування одержали властивості автономності від наявності в середовищі гормонів, мають назву „звичних”.

Однією з найбільш важких проблем у біології є розвиток багатоклітинних організмів. Поширеним шляхом вивчення цього питання є моделювання процесів онтогенезу на більш простих системах. При цьому використовують ізольовані тканини, клітини, протопласти, які культивують у стерильних

умовах. Після завершення дедиференціювання подальший розвиток калусної клітини може здійснюватися у кількох напрямках, а саме:

- 1) вторинним диференціювання різного ступеня складності;
- 2) у клітині може сформуватися стан стійкого диференціювання („звикання”);
- 3) калусна клітина може проходити свій цикл розвитку, який завершується її старінням та відмиранням.

Перший шлях фактично становить собою морфогенні процеси.

**2. Морфогенез, гістогенез, органогенез калусних тканин.** У культурі калусних тканин морфогенезом називають виникнення організованих структур з неорганізованої маси клітин.

Вторинне диференціювання калусної клітини може завершитися утворенням у калусній тканині окремих диференційованих клітин. Вони мають визначену будову і виконують специфічні функції. Прикладом цього є утворення епібластів – клітин, у яких запасуються вторинні метаболіти. Це найбільш простий тип диференціювання калусної клітини. Більш складне гістологічне диференціювання завершується утворенням у калусі різних тканин: млечників, волокон, трихом, елементів ксилеми і флоєми. Найскладнішим видом вторинного диференціювання є органогенез – утворення органів і соматичний ембріогенез – утворення із соматичних клітин ембріонів, біполярних зародкоподібних структур. Усі ці типи диференціювання можливі тільки завдяки властивості тотипотентності – будь-яка рослинна клітина вміщує повний набір генів, які характерні для того організму, з якого вона була виділена. Потенційні можливості всіх клітин цієї рослини однакові; кожна з них у визначених умовах може дати початок цілому організму.

Ідея про тотипотентність рослинної клітини була висунута Г. Хаберландтом ще в 1902 році, але не одержала експериментальних доведень. Властивість тотипотентності не

завжди реалізується, тому що потенційні можливості клітин різних типів неоднакові. В окремих з них гени у великому ступені репресовані, у зв'язку з чим прояв тотипотентності стає обмеженим.

Клітинну основу морфогенезу складає цитодиференціювання. Регенерація рослин починається з вторинного диференціювання клітин. При цьому диференційовані клітини знову набувають структури і функцій спеціалізованих. Морфогенезом у культурі калусних тканин можна керувати за допомогою внутрішніх факторів (видова приналежність вихідної рослини, орган, з якого взято експлант, вік експланту) та зовнішніх факторів (складу поживного середовища, температури, світла). При переобладнанні цитокинінів над ауксинами часто розпочинається стебловий органогенез, а у випадку переважання ауксинів над цитокинінами – кореневий. Слід зауважити, що з утвореної в культурі калусної тканини кореня майже ніколи не регенерує ціла рослина, а при стебловому органогенезі спочатку утворюється пагін, який потім (при пересадці на середовище з перебільшенням ауксинів) укорінюється і дає початок цілої рослини. Додатковими стимулами морфогенезу в культурі калусних тканин є присутність в поживному середовищі  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , окремих амінокислот (проліну, тирозину, іноді серину), поліамінів (путресцину і сперміді). Іони  $\text{NO}_3^-$  впливають на розвиток у калусній тканині організованих структур, а їх індукцію стимулюють іони  $\text{NH}_4^+$ .

Під впливом того чи іншого стимулу морфогенезу калусна клітина повинна стати детермінованою, але не всі клітини, а лише одна з 400–1000 стає на шлях регенерації. Для переходу до морфогенезу недостатньо лише стимулу, а необхідно, щоб клітина була здатна сприйняти стимули морфогенезу. Це явище має назву компетентності клітини.

Головну роль у гістогенезному перетворенні калусних клітин у судинні елементи відіграють фітогормони, в основному ауксини. Той же ефект має спільна дія ауксину з сахарозою. При підвищенні концентрації сахарози утворюються елементи флоєми, а зниженні – елементи ксилеми. Додавання до гормону

інших цукрів гістогенезу не викликало. В окремих випадках стимуляторами гістогенезу, крім ауксинів, можуть бути й інші фітогормони.

Органогенез прямо залежить від співвідношення фітогормонів. Перевага концентрації ауксину над цитокиніном викликає диференціювання клітин, яке приводить до утворення кореневої системи. Регенерації цілої рослини при цьому не здійснюється. При збільшенні концентрації цитокиніну та зменшенні ауксину розпочинається стебловий органогенез з утворенням пагона. Якщо цю рослину пересадити на свіже поживне середовище з перебільшенням ауксину, то спостерігається утворення коренів і цілої рослини. Для напряму органогенезу велике значення має належність рослини-донора до класу дводольних чи однодольних, його генотип, а також тип експланта. Калуси, одержані з верхівок міжвузля, здатні до флорального морфогенезу, а з нижнього міжвузля – давали тільки початок вегетативним органам.

Питання про механізм запуску вторинного диференціювання у калусних клітин достатньо не вивчене. Але встановлено, що всі морфогенетичні зміни активуються або контролюються спеціальними генами.

При соматичному ембріогенезі клітина-ініціал дає початок зиготі. Регенерант, який утворюється з соматичного зародка, повністю сформований, що виключає зайві витрати щодо укоріненню одержаних при органогенезі пагонів. Вони точніше відтворюють генотип вихідної рослини й можуть бути використані для одержання штучного насіння; дозволяють вивчати механізми ембріогенезу (усі фази, крім першої, збігаються в рослині та культурі).

**3. Ізольовані протопласти, їх одержання та культивування. Використання методу культури клітин і тканин в утворенні сучасних технологій. Кріозбереження.** Ізольований протопласт – це вміст рослинної клітини, який обмежений плазмолемою. Целюлозна стінка у нього відсутня. У цілій клітині протопласт можна спостерігати під час плазмолізу. Ізольовані протопласти – одні з найбільш цінних об'єктів у

біотехнології, тому що дозволяють досліджувати різні властивості мембран та транспорт речовин крізь плазмолему; до них легко вводити генетичну інформацію з органел, клітин інших рослин, прокаріотичних організмів, тварин; вони можуть легко зливатися з утворенням гібридних клітин.

Для одержання ізольованих протопластів використовують механічний (довгий, трудомісткий) та ферментативний з використанням целюлази, геміцелюлази, пектинази (більш перспективний). Ізольовані протопласти можна одержати з клітин рослинних тканин, культури калусів і суспензійної культури. Отримані умови для ізоляції протопластів для різних об'єктів індивідуальні. Важливим фактором при цьому є підбір осмотичного стабілізатора, у якості якого використовують цукри, іонні осмолітики (розчини  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ). Концентрація осмолітиків повинна бути дещо гіпертонічна, що призводить до стану і слабкого плазмолізу й гальмує метаболізм і регенерацію клітинної стінки.

Ізольовані протопласти можна культивувати на середовищах для росту ізольованих клітин та тканин. Після видалення ферментів у протопластів у культурі розпочинається формування клітинної стінки – утворюється ізольована клітина, яка здатна до поділу і формування клону. Регенерація цілих рослин з ізольованих протопластів має багато труднощів і вдалася, на сьогодні, тільки в рослин моркви, при поетапній стимуляції у тютюну, петунії та ще окремих рослин.

Клональним мікророзмноженням називають нестатеве розмноження рослин за допомогою методу культури тканин, який дозволяє отримувати рослини, ідентичні вихідній. В основі одержання таких рослин міститься здатність соматичних клітин рослин повністю реалізовувати свій потенціал розвитку, тобто властивість тотипотентності. Метод клонального мікророзмноження набуває все більш широкого поширення в усьому світі, а також становить комерційний характер.

У Росії перші роботи з клонального мікророзмноження було здійснено в 60-х роках ХХ ст. у лабораторії Р. Бутенка (Інститут фізіології рослин ім. К. Тімірязєва). Сьогодні створені і розвиваються лабораторії клонального мікророзмноження, які



реалізують потреби селекції, розмноження декоративних, лікарських та інших рослин, для розмноження кращих екземплярів, збереження рідкісних і зникаючих видів рослин.

Свою назву ця технологія розмноження отримала від терміна „клон” (з грец. *clon* – нащадок), який запропонував Веббер у 1903 році.

Клональне мікророзмноження має суттєві переваги перед традиційними способами розмноження, а саме:

1. Має високий коефіцієнт розмноження. Так, одна рослина за рік при мікротклональному розмноженні може дати до 1 млн. нових рослин, тоді як при звичайних способах розмноження – тільки близько 50–100 рослин.

2. Забезпечує отримання генетично однорідного посадкового матеріалу.

3. Дає можливість оздоровлення рослин, звільнення їх від вірусів завдяки клонуванню меристематичних тканин.

4. Підвищує можливість розмноження рослин, які в природних умовах репродукують з великими труднощами.

5. Відтворення посадкового матеріалу круглий рік, що значно економить площі, які займають маткові насадження.

6. Скорочення тривалості селекційного періоду завдяки ускореному переходу рослин від ювенільної фази розвитку до репродуктивної.

Обов'язковою умовою клонального мікророзмноження є використання об'єктів, які повністю зберігають генетичну стабільність на всіх етапах процесу, від експлантів до рослин у полі. Таким умовам відповідають клітини апексу й пазушні бруньки стеблевого походження, тобто меристематичні тканини. Їх стійкість до генетичних змін, можливо, пов'язана з високою активністю систем репарації ДНК, а також з негативною селекцією змінених клітин.

Процес клонального мікророзмноження розподіляють на три етапи:

1. Отримання добре зростаючої стерильної культури. На цьому етапі необхідно правильно підібрати рослину-донор, отримати вільну від інфекції культуру, забезпечити її виживання і швидке зростання на живильному середовищі.

2. Власне розмноження може здійснюватися кількома способами:

- активізацією пазушних меристем;
- індукцією утворення адвентивних бруньок тканинами листа, стебла, лусочками й донцем цибулин, кореневищем, зачатками суцвіть; мікрочеренкуванням зі збереженням апікального домінування; стимуляцією утворення мікробульб і мікроцибулинок; індукцією соматичного ембріогенезу.

3. Підготовка до висадки в поле або до реалізації. Це дуже важливий етап, під час якого в теплиці вкорінені рослини, які були отримані *in vitro*, адаптують до нових умов зовнішнього середовища, а саме: проводять закалювання рослин, підвищують їх стійкість до патогенних мікроорганізмів і різних несприятливих факторів зовнішнього середовища. Існує багато різних способів адаптування рослин до пересадки *in vivo*. Це підбір ґрунтового субстрату, створення певної вологості, обробка хімічними речовинами (гліцерин, парафін) для запобігання зневоднювання листа тощо.

Для запобігання механічних пошкоджень кореневої системи рослину пересаджують у ґрунт разом з агаром, заглиблюючи так, що над поверхнею ґрунту залишаються тільки два розвинені листки, які вирости у пробірці й уже адаптувалися до зовнішніх умов. Така методика дозволяє значно спростити, прискорити та здешевити етап акліматизації рослин.

Клональне мікророзмноження рослин здійснюють різними способами:

1. Спосіб активізації пазушних меристем є основним способом. Він полягає в знятті апікального домінування та активізації розвитку меристем, які існують у рослині. Цей спосіб є основою звичайного вегетативного розмноження. На інтактній рослині зняття апікального домінування досягається видаленням апікальної меристеми пагона або завдяки дії цитокінінів. При клонуванні цитокініни додають у живильне середовище, що призводить до розвитку численних пазушних пагонів. Ці пагони відділяють від первинного експланту й культивують на свіжому поживному середовищі. Активізацію пазушних меристем широко використовують у промисловому розмноженні овочевих

сільськогосподарських культур (картопля, томати, огірки), квітів (гвоздика, троянда, гербера), плодових та ягідних культур (яблуня, вишня, малина, агрус), дерев'янистих рослин (туя, ялівець). Однак нескінчено розмножуватися таким способом рослини не можуть, оскільки тривалий вплив цитокінінів, що належать до складу живильних середовищ, викликає аномалії в морфології стебла, втрату здатності пагонів до вкорінення, загибель рослин.

2. Спосіб індукції розвитку адвентивних бруньок, що виникають з рослинних клітин і тканин, які їх зазвичай не утворюють. Цей метод значною мірою зумовлений тотіпотентністю клітин. Будь-який орган або тканина рослини, які є вільними від інфекції, можуть бути використані як експланти і, за певних умов, утворюють адвентивні бруньки. Цей процес викликають унесенням у поживне середовище певних концентрацій цитокінінів і ауксинів, причому цитокінінів повинно бути набагато більше, ніж ауксинів. Цей спосіб є найбільш поширеним способом мікророзмноження вищих рослин. Розвиваючи адвентивні бруньки на апікальних і пазушних меристемах, розмножують рослини томата, цибулі, часнику; на сегментах листових пластинок – салат, фіалка; на тканинах донця цибулин – цибуля, часник, гладіолуси, тюльпани тощо.

3. Спосіб мікрочеренкування пагона, який зберігає апікальне домінування. Рослини-регенеранти можна черенкувати в стерильних умовах, висаджувати на свіже поживне середовище, укорінювати і адаптувати до польових умов або знову піддавати мікрочеренкуванню для того, щоб збільшити кількість посадкового матеріалу.

4. Спосіб розмноження мікроклубнями в біореакторах. Це один із способів прискореного розмноження оздоровленого матеріалу. Технології клонального мікробульбами в біореакторах розроблено для сільськогосподарських та декоративних рослин, але створені реактори мають лабораторний характер.

5. Спосіб розмноження з утворенням соматичних зародків, який засновано на морфогенних змінах, тобто

соматичному ембріогенезі. Уперше це явище було відзначено в культурі клітин моркви де формування ембріодів у культурі здійснюється у два етапи:

- по-перше соматичні клітини диференціюються в ембріональні за наявності в поживному середовищі ауксинів;
- потім розвиваються ембріоди, цей процес здійснюється тільки при значному зниженні концентрації ауксину або повній відсутності його у поживному середовищі.

Соматичний ембріогенез може здійснюватися в тканинах первинного експланту, у калусній і суспензійній культурах. Оскільки соматичні зародки становлять собою повністю сформовані рослини, цей метод дозволяє скоротити витрати, пов'язані з підбором умов укорінення й адаптації рослин-регенерантів. Крім того, переваги одержання соматичних ембріодів полягають у тому, що при використанні відповідної техніки капсулювання з них можна отримувати штучні насіння. Соматичний ембріогенез у наш час застосовують для розмноження пшениці, ячменю, моркви, винограду, дубу, евкаліпту.

Велике значення для успішного клонального розмноження мають фізичні фактори, а саме: температура, умови освітлення, якість світла, вологість.

Для поліпшення клонального мікророзмноження фізичні фактори необхідно підбирати з урахуванням природного ареалу рослини, яку культивуємо. Так, для тропічних рослин оптимальна температура культивування приблизно становить 27°C, для рослин альпійських лугов – 18–20°C, для більшості рослин – близько 25°C. Життєздатність експлантів збільшується, якщо на початку вирощування підтримувати більш низькі температури. Оптимальною є інтенсивність освітлення для більшості рослин – 1000–3000 лк протягом 14–16 год. на добу.

Істотне значення для регуляції морфогенезу має якість світла. Так, у мікрочеренків берези червоне світло сприяло 100 %-му вкоріненню.

Відносна вологість у камерах, де ростуть рослини у пробірках, підтримується на рівні 65–75%. При пересадці в ґрунт ці рослини потребують підвищеної вологості, що при

вирощуванні в камерах досягається створенням атмосфери „туману”.

Оздоровлення посадкового матеріалу розпочинається з моменту стерилізації експлантів в асептичних умовах боксу, з оброблення тканини антибіотиками. Проте таким чином вдається видалити головним чином бактерії, гриби, нематоди, а віруси, віроїди, мікоплазми залишаються в тканинах рослин. Саме через вірусні хвороби гине від 10 до 50 % урожаю сільськогосподарських культур, що розмножуються вегетативно. Окремі бобові рослини (соя) можуть передавати віруси навіть при насіннєвому розмноженні.

У 1949 р. було з'ясовано, що клітини меристематичних тканин рослин зазвичай не містять вірусів. У 1952 році Дж. Морель і Г. Мартін запропонували отримувати здорові, вільні від вірусної інфекції рослини, культивуючи меристеми. Вони з'ясували, що при вирощуванні верхівки пагона, що складається з конуса наростання і 2–3 листових зачатків, на ньому утворюються сферичні утворення. Ці утворення поділяються й утворюють генетично однорідні безвірусні рослини. На цей момент культивування меристем пагона – найбільш ефективний спосіб оздоровлення рослинного матеріалу від вірусів, віроїдів та мікоплазм. Однак при цьому способі потрібно дотримуватися особливих правил, причому, чим менше розмір меристемних експлантів, тим важче викликати в ньому морфогенез. Чим більший розмір експлантів, тим легше здійснюється морфогенез й утворюється ціла рослина, але тим більша можливість наявності вірусів в експланті. У видів і сортів рослин зона, яка є вільною від вірусних частинок, неоднакова. На практиці часто не вдається знайти оптимальне співвідношення між розміром меристематичного експланту й морфогенезом у ньому, одночасно позбавившись від інфекції. Тому доводиться доповнювати метод культури меристем термо- або (і) хеміотерапією, але цей прийом може викликати відставання рослин у зростанні, деформацію органів, збільшення прихованих інфекцій.

Сьогодні для діагностики вірусумісних рослин

застосовують імуноферментну техніку, моноклональні антитіла, методи молекулярної гібридизації тощо. Ці методи дуже чутливі, але трудомісткі й дорогі.

Після оздоровлення за допомогою перерахованих вище технологій нормальні рослини-регенеранти розмножують звичайними методами клонального мікророзмноження. Для окремих рослин, наприклад, цитрусових, провести морфогенез з меристем малого розміру не вдається, тому розробляються оригінальні методи.

Збереження різноманітності форм життя є найважливішою проблемою, з якою зіткнулася сучасна наука, тому що збереження біорізноманіття – єдиний механізм стабілізації життя на Землі.

Людству необхідне виведення нових сортів, а для успішної селекції важливим є постійне поповнення генами з нових джерел. Традиційним джерелом генетичного матеріалу є дикорослі види рослин. Однак ці види поступово витісняються, а багато з них перебувають на межі вимирання, тому їх необхідно зберегти.

Існує кілька способів збереження генофонду вищих рослин – створення заповідників, національних парків, банків насіння. Останнім часом велика увага приділяється створенню і розвитку нових способів: пересаджувальних колекцій калусних клітин, депонування культур клітин і кріозбереження.

Кріозбереження – це спосіб зберігання об'єктів при дуже низькій температурі, зазвичай це температура рідкого азоту (-196°C). Кріозбереження має багато переваг порівняно з іншими методами. При збереженні в глибоко замороженому стані повністю припиняється обмін речовин, відсутні значні фізико-хімічні, молекулярні зміни не тільки в клітині, а й у навколишньому середовищі – зберігається генофонд, тобто всі властивості замороженого об'єкта.

Сутність методу кріозбереження зводиться до заморожування спеціально підготовлених рослинних клітин за допомогою кріопротекторів – речовин, які послаблюють пошкодження клітин при заморожуванні і відтаюванні. Відомо два методи кріозбереження:

– програмне (повільне) – широко застосовується для збереження тваринних і рослинних клітин, тому що вивчається довго;

– надшвидке заморожування – вивчається порівняно недавно, проте вважається, що саме цей метод з часом стане найбільш перспективним.

Труднощі кріозбереження рослин пов'язані зі специфікою рослинних клітин. Клітини рослин мають великі розміри, міцну целюлозну стінку і вакуолі. Причому, саме наявність вакуолі, яка займає до 90% загального обсягу клітини, характеризує основну роль у стійкості клітин до дії низьких температур. Тому привести клітину до загибелі, при заморожуванні, може утворення льоду й дегідратація. Кристали льоду спочатку утворюються у зовнішньому розчині, навколо клітин, максимальна швидкість їхнього зростання залежно від складу розчину перебуває в межах від  $-20$  до  $-60^{\circ}\text{C}$ . При температурі  $-140^{\circ}\text{C}$  зростання кристалів льоду зовсім припиняється. Отже, при заморожуванні та при відтаюванні клітинам важливо швидко пройти температуру утворення льоду. Уникнути кристалізації льоду допомагає затвердіння її в аморфному стані. Додавання кріопротекторів ускладнює кристалізацію льоду і сприяє затвердінню в аморфному стані.

Найбільш відомі такі кріопротектори, як диметилсульфоксид (ДМСО), різні цукри, гліцерин, етиленгліколь та їх похідні. Дія кріопротекторів полягає в зниженні кількості вільної води, підвищенні в'язкості розчину. Кріопротектори умовно поділяють на дві групи: проникаючі та непроникаючі. Зазвичай використовують суміші кріопротекторів, оскільки в них токсичність однієї з речовин знижується за рахунок наявності іншої.

Життєздатність клітин після заморожування залежить не тільки від попередження утворення льоду, але і від особливостей клітин. Великі вакуолізовані клітини гинуть набагато частіше, ніж дрібні меристемодні. Тому на етапі підготовки культури до заморожування її культивують в умовах, які сприяють утворенню дрібних клітин та синхронізації їх поділу.

Крім того, концентрування клітин у культурі, тобто збільшення її щільності, сприяє підвищенню виживання клітин після заморожування.

Так, кріозбереження досить надійно забезпечує збереження генофонду. Перспективність цього методу підтверджується відновленням після зберігання в рідкому азоті багатьох культур. З відновлених після заморожування культур моркви та тютюну вдалося регенерувати цілі рослини. Однак для кріозбереження потрібна складна робота щодо підбору умов, які забезпечують виживання клітин і можливість подальшої регенерації з них цілих рослин, а саме врахування генетичних та морфологічних особливостей клітин, здатність до закалювання, рівень проникності клітинних мембран, підбір кріопротекторів, швидкість зниження температури при заморожуванні, умови відтавання тощо.

#### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Дайте визначення поняття калусні клітини та тканини, процесів дедиференціювання та калусогенезу.
2. Складіть загальну характеристику калусних клітин та тканини.
3. Схарактеризуйте умови формування калусної тканини.
4. Встановіть особливості та умови протікання процесу дедиференціювання, як основи калусогенезу.
5. Визначте особливості протікання процесів морфогенезу, гістогенезу та органогенезу калусних клітин, механізм запуску вторинного диференціювання.
6. Схарактеризуйте умови виникнення популяції соматичних клітин та їх властивостей (фізіологічна асинхронність та генетична гетерогенність).
7. Визначте методи одержання ізольованих протопластів та особливості їх культивування, значення ізольованих протопластів при утворенні нових форм рослин.
8. Установіть можливі сфери використання методів культури клітин і тканин (одержання вторинних метаболітів для вирішення проблем сільського господарства тощо).
9. Схарактеризуйте кріозбереження як один з варіантів



збереження генофонду, назвіть його особливості, переваги та недоліки.

### **Література:**

1. Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988 . – 479 с.
2. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.
3. Калашникова Е. А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева. – М. : КолоС, 2006. – 144 с.
4. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин / М. М. Мусієнко. – К. : Вища шк., 2001. – С. 348–363.
5. Мусієнко М. М. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин / М. М. Мусієнко, О.О. Панюта. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 46 с.
6. Катаева Н., Бутенко Р. Клональное микроразмножение растений / Н. Катаева, Р. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 238 с.

## **Тема № 9: БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОБЕЗПЕКА**

**Мета:** визначити поняття безпека та біобезпека, Схарактеризувати особливості біобезпеки в різних напрямках біотехнології. Установити особливості державного контролю та регулювання у галузі генно-інженерної діяльності. Визначити основні проблеми розвитку біотехнології в Україні.

**1. Поняття про безпеку.**

**2. Державний контроль та регулювання в галузі генно-інженерної діяльності. Нормативні документи біотехнологічних виробництв.**

**3. Перспективи та проблеми розвитку біотехнології у світі та в Україні.**

Біотехнологія – одна з небагатьох наук, яка змінює та використовує механізми формування властивостей живих істот (спадковість, мінливість, енергообмін, адаптація, стійкість, продуктивність та якість). Штучні зміни генетичного матеріалу біологічних об'єктів призводять до змін структури та функціонування цих організмів. Але наслідки цих змін не завжди можна чітко спрогнозувати. Це викликає стурбованість у суспільстві та призводить до зниження темпів розвитку окремих біотехнологічних напрямів.

**1. Поняття про безпеку.** Фактори зовнішнього середовища (природні, техногенні) та інші постійно впливають на людину й мають позитивний або негативний характер.

Одним з головних завдань будь-якого суспільства є захист від усіх зовнішніх чи внутрішніх впливів, тобто створення стану безпеки. Під безпекою розуміють стан захищеності життєво важливих інтересів особистості, життя людини, суспільства, держави від зовнішніх та внутрішніх небезпечних факторів.

Головним об'єктом безпеки є людина, але вона не може бути забезпечена без захисту середовища суспільства.

Досягнення безпеки – це результат роботи системи, яка

уживає заходів, адекватних прогнозам життєво важливих інтересів залежно від напрямку та ступеня впливу шкідливих факторів. Безпека може бути біологічною, екологічною, економічною, продовольчою, військовою та іншою. Сьогодні біотехнологія забезпечує підвищення безпеки в багатьох напрямках, необхідних людині, суспільству, державі тощо. Одним з прикладів може бути використання досягнень біотехнології для створення екологічної біобезпеки.

### ***Утилізація відходів***

#### ***Деструкція забруднюючих речовин, які важко розкладаються***

**Екологія**

***Утворення альтернативних технологій у різних галузях***

#### ***Утворення замкнутих виробничих циклів***

#### ***Підтримання біорізноманіття***

#### ***Відтворення природних біоценозів***

Останнім часом усе важливішою стає біобезпека людини, суспільства, держави та цивілізації в цілому.

Біобезпека містить захист людини, суспільства, цивілізації від шкідливого та небезпечного для життя та здоров'я людини впливу біологічних речовин та сполук, які вміщуються в природних або штучних (генномодифікованих) біологічних об'єктах та одержаних з них продуктів. Біологічно небезпечні організми та продукти з них становлять загрозу для людини, тварин, рослин та мікроорганізмів, викликаючи їх ураження або загибель.

Проблеми біобезпеки існують давно, але й сьогодні небезпеку становлять отруйні гриби, великого масштабу набуває алкогольна токсикація, наркоманія.

**1.1. Біобезпека в клітинних та тканинних і органогенних біотехнологіях.** У клітинних технологіях через одержання та використання клітин зі зміненою спадковістю, необхідно постійно спостерігати за спектром соматичних варіабельностей, появою мутантів з позитивними або негативними властивостями.

У клітинних технологіях з рослинами в цілому складається безпечна ситуація. Тому що лабораторний та польовий контроль, які є основою системи державного іспиту та реєстрації сортів та гібридів рослин за одержанням клітинних реагентів, виявляють та вилучають небезпечні варіанти.

При одержанні продуктів вторинного метаболізму, фармакологічного або харчового виробництва, на основі культури клітин та суспензій, у біореакторах, контроль за можливими змінами норм основних їх параметрів або якості продукції, яку одержують, проводять автоматично.

Більш ретельний контроль потрібний при використанні клітинних та тканинних технологій у тваринництві тому що в них при порушенні техніки та технології зберігання і використання можуть накопичуватися поживні речовини.

**1.2. Біобезпека в біоінженерії та транс генних технологіях.** Початок дискусії щодо проблем біобезпеки в біоінженерії поклали самі вчені, які заснували цей напрям. У 1974 році одинадцять учених, яких очолював П.Берг, який створив першу рекомбінантну ДНК, склали лист до світового суспільства, де запропонували не проводити досліди з рекомбінантними ДНК до проведення міжнародної конференції за цією проблемою.

У 1975 році на конференції в Асило Марє (США) учені прийняли рішення, що ці роботи небезпечні не більш ніж в інших сферах, але необхідний суворий контроль за біобезпечністю.

Наприкінці 70-х років, у більшості країн світу, були розроблені відповідні правила, які регламентували роботу з рекомбінантними організмами. З часом ці правила коректувалися та пом'якшувалися внаслідок підтвердження біобезопасності генної інженерії при проведенні робіт протягом

більше тридцяти років.

Але ризик появи небезпечних мутантів у звичайних напрямках одержання трансгенних організмів гіпотетично існує постійно і пов'язано це з:

- труднощами адресної вставки гену або групи генів у ДНК реципієнтної клітини, а також досягнення їх нормальної експресії (функцювання);

- можливістю одержання мутантів з небезпечним для людини генотипом;

- підвищенням ризику утворення мутантів при введенні штучних, синтетичних генів для одержання трансгенних рослин, тварин та мікроорганізмів, та не визначення дії їх на організм людини при використанні як харчових та інших продуктів;

- можливістю спонтанного перенесення окремих генів та взаємодією з генами третіх генотипів, що може призвести до появи нових небезпечних генотипів.

Крім того, звертаючи увагу на світовий тероризм, необхідно визначити і можливість використання біоресурсів у небезпечних цілях. Тому у світовому суспільстві постає проблема запобігання досягнень біологічної науки з цією метою.

Забезпечити стабільну біобезпеку в біоінженерії вчені можуть за рахунок:

- використання природних генів, які характеризуються стійким характером репарації процесів біосинтезу білків та їх якості;

- використання сучасних методів моніторингу та виявлення небезпечних генотипів, які постійно оновлюються, на етапі утворення ГМО в лабораторії, що забезпечить використання для утворення модифікованих організмів відомих, перевірених природних генів та їх регуляторних генетичних структур.

У цілому ситуація досліджень з трансгенними організмами повинна бути під суворим контролем учених та держави, необхідне постійне вдосконалення техніки, методів, технологій та критеріїв біобезпеки генетично модифікованих організмів.

**1.3. Критерії, показники та методи оцінки генетично модифікованих організмів та продуктів з них.** Основою оцінки біобезпеки генетично модифікованих організмів та продуктів харчування з них є санітарно-гігієнічна експертиза, яка вміщує визначення:

- хімічного складу вихідних та трансгенних організмів;
  - зміни біологічної цінності та засвоюваності виготовлених з ГМО продуктів;
  - впливу на імунну систему людини та можливість виникнення алергії;
  - токсичності, канцерогенності або мутагенності;
  - впливу на репродуктивні функції тварин та людини.
- Харчова продукція з ГМО проходить також обов'язкову медікобіологічну оцінку.

Оцінку генетичних змін рослин здійснюють за такими критеріями:

- виявлення можливостей передачі ділянки ДНК, яка вбудована в рослину, іншим організмам та потомству;
- визначення можливості впливу вбудованого геному на ураженість хворобами та шкідниками;
- установлення можливого впливу трансгенних рослин на ґрунтову мікрофлору та інші компоненти біоценозу.

**2. Державний контроль та регулювання в галузі генно-інженерної діяльності. Нормативні документи біотехнологічних виробництв.** В усіх державах прийняті закони та акти, що складають нормативно-правову базу для біотехнології та біоінженерії. Вони відповідають міжнародним вимогам ООН, ЮНЕСКО та інших міжнародних організацій.

Держава, відповідно до цих законів, повинна:

- установлювати основні напрями діяльності органів правління, юридичних то приватних осіб у галузі генно-інженерної діяльності;
- установлювати положення правового регулювання відносин в цій галузі діяльності;
- визначити механізми забезпечення безпеки громадян та зовнішнього середовища від цієї діяльності та їх результатів;

- установлювати правові основи міжнародної співпраці за цими напрямками;
- створювати умови для пріоритетних напрямів у цій галузі.

Законодавством встановлено чотири рівні ризику від потенційного шкідливого впливу діяльності в генетично інженерній сфері:

1-й рівень – відповідає роботам, які не мають загрози для здоров'я людини та співналежать з ризиком при роботі з непатогенними мікроорганізмами;

2-й рівень – відповідає роботам, які мають незначну загрозу для здоров'я людини та співналежать з ризиком при роботах з умовно-патогенними мікроорганізмами;

3-й рівень – відповідає роботам, які мають помірну загрозу для здоров'я людини та співналежать з мікроорганізмами потенційно здатними до передачі інфекції;

4-й рівень відповідає роботам, які мають високу загрозу для здоров'я людини та співналежать зі збудниками особливо небезпечних інфекцій.

Генно-інженерна діяльність в умовах закритих систем відповідає 3 та 4-м рівням загрози.

Розроблено вимоги до людей, які займаються генно-інженерною діяльністю:

- обов'язкова професійна підготовка;
- відповідний стан здоров'я;
- відповідність умовам безпеки цієї діяльності;
- наявність приміщень, які відповідають вимогам безпеки цієї діяльності;
- обов'язкове одержання ліцензії при роботах, які відповідають 3 та 4-м рівням.

Вимоги до стандарту та сертифікації генно-інженерної продукції (послуг) містять:

- відповідність вимогам екологічної безпеки;
- відповідність санітарним нормам;
- відповідність фармакологічним статтям;
- відповідність державному стандарту.

Ця продукція обов'язково проходить сертифікацію.

Усі організації, що займаються діяльністю цього напрямку, обов'язково проходить реєстрацію, яка дійсна до 5-ти років.

Результати вивчення біотехнологічних процесів та формування технологічних схем виробництва продуктів біотехнології повинні оформлюватися у вигляді спеціальних нормативних документів. Існує два такі основні документи:

- технічні умови на продукт – регламентують якісні та кількісні характеристики самого продукту біотехнології;
- технічний регламент виробництва – визначає спосіб одержання продукту та всі необхідні для цього матеріали.

Усі ці документи оформлюються відповідно до чинних стандартів.

Технічні умови (ТУ) на продукт – становлять сукупність вимог до характеристики та якості готового продукту, які дозволяють його стандартизувати, сертифікувати та відбракувати.

Технічні умови містять:

- відомості про призначення продукту;
- форму виробництва (паста, суспензія, ампули, таблетки, гранули й т. ін.);
- відомості про наявність сортності продукту з урахуванням його якості;
- опис характеристик продукту (органоліптичні – колір, запах, смак, консистенція й т. ін.; вміст основних компонентів; засміченість мікроорганізмами (загальна та санітарно-показова мікрофлора; токсичність, канцерогенність, кумулятивність, для живих культур – патогенність; фізичні характеристики).

**3. Перспективи та проблеми розвитку біотехнології у світі та в Україні.** Перед біотехнологією, як важливою галуззю біологічної науки, відкриваються значні перспективи як у теоретичному, так і в практичному аспектах. Так, сьогодні з'являються нові галузі біологічного дослідження, які виявляють і вивчають ознаки живого й можливість їх трансформації в біотехнічні системи. Актуальним і перспективним є застосування біотехнології для вирішення проблем охорони



навколишнього середовища, таких як:

- використання біотехнології для освоєння мінеральних ресурсів;
- заміна хімічних технологій, що не підлягають циркуляції, на біотехнології;
- інтенсифікація використання біодобрив;
- утилізація біомаси та різних видів органічних відходів; видалення та знешкодження забруднюючих речовин;
- ефективна очистка стічних вод;
- отримання стійких до стресових чинників рослин для відтворення та відновлення земель і лісів;
- збереження біологічної різноманітності.

Однак, понизку із перспективами, існують і проблеми щодо наслідків практичного застосування досягнень біотехнології. До таких проблем належать експерименти, пов'язані із заплідненням у пробірці (*in vitro*) яйцеклітин та отримання дітей з пробірки.

Ще однією соціально-етичною проблемою є визначення соціально-генетичного статусу людей. Йдеться про введення в практику генетичного дослідження людей, створення їх нуклеотидних карт, прагнення використовувати молекулярно-генетичних карт для визначення професійної орієнтації та зайнятості людей. У зв'язку з цією можливістю оголошення результатів генетичного обслідування у суспільстві може призвести до виникнення проблеми захисту людей з несприятливими генотипами у плані вибору ними професії, прийняття на роботу, навчання тощо.

Складною і важливою етичною проблемою біотехнології є проведення експериментів, спрямованих на створення за допомогою генетичної інженерії нових видів біологічної (бактеріологічної) зброї. Бактеріологічною зброєю можуть бути культури збудників особливо небезпечних хвороб (чуми, холери, туляремії, бруцельозу тощо).

Методологія генної інженерії дозволяє створювати резистентні до всіх сучасних лікарських речовин штами бактерій і віруси, які важко діагностувати. Ці штами характеризуються підвищеною вірулентністю, здатністю довго

перебувати в навколишньому середовищі в незміненому вигляді; легко пристосовуються до умов внутрішнього середовища організму людини і тварин і викликати захворювання з невідомою клінічною картиною.

З використанням методів біотехнології на основі токсинів можливим стає створення супертоксинів, що здатні до масового знищення живих організмів. Саме тому нові різновидності мікроорганізмів, створені з використанням методів біотехнології, до їх упровадження в практику повинні бути ретельно апробовані й оцінені з точки зору їх впливу на здоров'я людей і збереження генетичної різноманітності та екологічного балансу в біосфері.

Важливого значення набуває розширення і зміцнення міжнародні співпраці щодо оцінки й регулювання ризику використання біологічних об'єктів, які в умовах відсутності необхідного контролю за їх функціонуванням, можуть впливати на живі системи й людину як біологічна зброя. Тому надзвичайно важливими є наукова експертиза, прогноз використання біотехнічних систем.

Сьогодні Україна характеризується низьким рівнем розвитку біотехнологічного виробництва в більшості напрямів. Відставання України та країн СНД від міжнародного рівня розвитку в напрямі генетично-інженерної діяльності, насамперед, пов'язане з недостатнім фінансуванням таких досліджень та складністю впровадження у виробництво. Так, сьогодні не зареєстровано жодного вітчизняного генномодифікованного сорту або гібриду сільськогосподарських культур вітчизняного виробництва.

Найважливішими завданнями для досягнення високого рівня розвитку є:

- створення та реалізація наукових програм з біотехнології, біоінженерії, біобезпеки;
- визначення цього біотехнологічного напрямку одним з найважливіших у ХХІ столітті;
- пріоритетне фінансування розвитку біотехнології, біоінженерії, біобезпеки;
- оснащення біоінженерних наукових організацій

сучасним науковим обладнанням;

– забезпечення інформування населення держави про зміст та результати досліджень цього напрямку;

– залучення до реалізації програм молодих дослідників та утворення оптимальних умов їх роботи;

– розробка та реалізація спільних міжнародних програм.

### **Питання та завдання до самоконтролю:**

1. Що таке біобезпека?
2. Схарактеризуйте рівень біобезпеки в клітинних, тканинних та органогенних біотехнологіях, в біоінженерії та трансгенних технологіях.
3. До якого рівня ризику належить діяльність в генетично-інженерній сфері?
4. Які вимоги пред'являють до людей, які займаються генно-інженерною діяльністю?
5. Які документи регламентують якість біотехнологічного продукту?
6. Що визначають основні документи, технології виробництва біотехнічного продукту?
7. Які характеристики вміщують технічні умови на біотехнологічний продукт?
8. Схарактеризуйте найважливіші завдання розвитку біотехнології в Україні.
9. Які існують проблеми щодо наслідків практичного застосування досягнень біотехнології.

### **Література:**

1. Мамедов Н. М. Экология / Н. М. Мамедов, И. Т. Суравегина. – М. : Школа-Пресс, 1996. – С. 437–440.
2. Пехов А. П. Биология с основами экологии / А. П. Пехов. – СПб. : Лань, 2000. – С. 635–648.
3. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
4. Сазыкин Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Изд. центр „Академія”, 2007. – 256 с.

## ПИТАННЯ ДО ДРУГОГО МОДУЛЬНОГО КОНТРОЛЮ

1. Особливості та сутність генетичної інженерії.
2. Історія розвитку генетичної інженерії.
3. Характеристика біотехнології рекомбінантних ДНК.
4. Положення конструювання рекомбінантної ДНК.
5. Сутність експресії сторонніх генів.
6. Особливості клонування та експресії генів у різних організмах.
7. Сутність генетичної інженерії у тваринництві.
8. Одержання інсуліну на основі методів генетичної інженерії.
9. Особливості одержання соматотропіну на основі методів генетичної інженерії.
10. Сутність генетичної інженерії рослин.
11. Одержання трансгенних рослин.
12. Застосування методів генетичної інженерії для покращення амінокислотного складу запасних білків рослин.
13. Підвищення ефективності процесу фотосинтезу.
14. Генно-інженерні підходи до вирішення проблеми засвоєння азоту.
15. Підвищення стійкості рослин до фітопатогенів за рахунок генно-інженерних методів.
16. Одержання рослин, стійких до гербіцидів, за рахунок генно-інженерних методів.
17. Підвищення стійкості рослин до комах за рахунок генно-інженерних методів.
18. Зміна стійкості рослин до абіотичних стресів за рахунок генно-інженерних методів.
19. Поняття культура клітин і тканин, історія розвитку біотехнології культури клітин та тканин.
20. Особливості методів та умов культивування ізольованих тканин і клітин.
21. Дедиференціювання як основа калусогенезу.
22. Типи культури клітин і тканин.
23. Загальна характеристика калусних клітин.

24. Морфогенез у калусних тканинах як прояв тотипотентності рослинної клітини.

25. Ізольовані протопласти, їх отримання і культивування.

26. Використання методу культури ізольованих клітин і тканин у створенні сучасних технологій.

27. Клональне мікророзмноження та оздоровлення рослин.

28. Особливості та призначення кріозбереження.

29. Сутність та стан проблеми біобезпеки.

30. Біобезпека в клітинних, тканинних та органогенних біотехнологіях.

31. Біобезпека в біоінженерії і трансгенозі.

32. Критерії, показники й методи оцінки генетично модифікованих організмів і продуктів, які одержують з них.

33. Державне регулювання генно-інженерної діяльності у світі та Україні.

34. Шляхи подолання відставання біотехнології, біоінженерії та біобезпеки в Україні.

## СЛОВНИК ОСНОВНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ТЕРМІНІВ

**Анаеробне бродіння** – процес розкладання субстрату анаеробними мікроорганізмами, який не потребує для нормальної життєдіяльності наявності кисню.

**Ауксини** – фітогормони, які стимулюють утворення коренів у живців.

**Бактеріофаги (фаги)** – віруси, які здатні інфікувати бактерії.

**Бібліотека геному** – набір клонованих фрагментів ДНК, що містить весь геном.

**Біобезпека** – стан захищеності людини, суспільства, цивілізації і навколишнього середовища від шкідливого, небезпечного для життя і здоров'я людини впливу токсичних, алергенних біологічних речовин і сполук, які містять природні або генно-інженерно модифіковані біологічні об'єкти та отримані з них продукти.

**Біогаз** – газ, який утворюється в результаті анаеробного бродіння субстрату, складається з метану (до 60%), вуглекислого газу (35-40%) і незначної кількості інших газів (сірководню, водню до 2%).

**Біогенез** – утворення органічних сполук живими організмами.

**Біоконверсія** – отримання біогазу з органічних відходів методом їх зброжування в спеціальних реакторах-метантенках.

**Біологічна поживна цінність білків** – показник, який виражає збалансованість білка за вмістом незамінних амінокислот.

**Біомаса** – загальна маса особин одного виду, групи видів чи спільноти в цілому на одиницю поверхні або об'єму місцеперебування.

**Біотехнологія класична** – наука про методи й технології виробництва, зберігання і переробки сільськогосподарської та іншої продукції з використанням звичайних, нетрансгенних рослин, тварин та мікроорганізмів у природних і штучних умовах.

**Біотехнологія сучасна** – наука про генно-інженерні та клітинні методи й технології створення та використання генетично трансформованих (модифікованих) рослин, тварин, мікроорганізмів і вірусів з метою інтенсифікації виробництва та отримання нових видів продуктів різного призначення.

**Біофільтр** – споруда для біологічного очищення стічних вод, яка становить собою круглий або прямокутний резервуар з подвійним дном, наповнений фільтруючими матеріалами.

**Біоценоз** – сукупність рослин, тварин і мікроорганізмів, які населяють окрему ділянку суші, об'єм води і повітря, характеризуються певними відносинами між собою і пристосованістю до умов навколишнього середовища.

**Біоенергетика** – розділ науки про закономірності перетворення енергії в процесах життєдіяльності організмів.

**Вектор** – самореplikована (автономна) молекула ДНК, яка використовується в генній інженерії для перенесення генів та інших послідовностей від організму-донора до організм-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

**Ген** – одинична структура генетичної інформації, ділянка молекули ДНК, що кодує структуру одного або кількох поліпептидних ланцюгів або молекул РНК і має певну будову.

**Генна інженерія** – сукупність прийомів, методів і технологій, зокрема й технологій отримання рекомбінантних ДНК і РНК з генів із організму, здійснення маніпуляцій з ними й уведення їх в інші організми.

**Генно-інженерна діяльність** – діяльність учених, фахівців, наукових організацій і державних органів, яка спрямована на отримання, випробування, транспортування та використання генетично-модифікованих організмів (ГМО) і отриманих із них продуктів.

**Генетичний код (ГК)** – система запису спадкової інформації у вигляді послідовності нуклеотидів у молекулах нуклеїнових кислот. Одиницею ГК є кодон або триплет (трінуклеотид). ГК визначає послідовність включення амінокислот до поліпептидного ланцюга, який синтезується.

**Генетичний ризик** – можливість прояву

непередбачуваних, небезпечних для здоров'я і життя людини, навколишнього середовища спадкових змін геному та якості організму.

**Геном** – весь генетичний матеріал, що міститься в хромосомах конкретного організму.

**Генотип** – сукупність усіх генів організму.

**Генофонд** – сукупність генів популяції.

**Ген-мішень** – конкретний ген, що становить інтерес для дослідника.

**Гібереліни** – фітогормони, які активізують ріст стебел, викликають проростання насіння.

**Гібридизація** – комплементарний відпал двох полінуклеотидних ланцюгів, зазвичай з різних джерел, з утворенням ДНК/ДНК- або ДНК / РНК-гібридів.

**Гістогенез** – процес формування тканин.

**Дедиференціація** – перехід спеціалізованих клітин, що не поділяються до утворення недиференційованих калусних клітин, що поділяються.

**Детермінація розвитку** – набуття клітиною, тканиною, органом або організмом стану готовності до розвитку певним шляхом, що супроводжується одночасним обмеженням можливостей розвитку в інших напрямках. У цей період детермінації створюються необхідні внутрішні умови для подальшої реалізації нового напрямку розвитку.

**Диференціація** – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між дочерніми клітинами, а також між материнськими й дочерніми клітинами.

**ДНК** – молекула дезоксирибонуклеїнової кислоти, полімер, мономерами якого є нуклеотиди, що з'єднані 5<sup>1</sup>–3<sup>1</sup> фосфодіефірними зв'язками.

**ДНК-лігаза** – фермент, який з'єднує 3<sup>1</sup>-ОН і 5<sup>1</sup>-фосфатні кінці двох сусідніх нуклеотидів у місці розриву одного ланцюга ДНК унаслідок утворення фосфодіефірного зв'язку.

**Каллус** – неорганізована проліферуюча тканина, що складається з дедиференційованих клітин.

**кДНК** – одноланцюжкова ДНК, яка комплементарна



мРНК, синтезується *in vitro* на РНК-матриці за допомогою зворотної транскрипції (фермент – зворотна транскриптаза, РНК-залежна ДНК-полімераза).

**Клітинна селекція** – метод виділення мутантних клітин і соматоклональних варіацій в умовах *in vitro*.

**Клон** – популяція клітин або молекул, які ідентичні одній родоначальній клітині або молекулі.

**Клональне мікророзмноження** - отримання рослин, генетично ідентичних вихідній рослині, нестатевим шляхом в умовах *in vitro*.

**Клонування** – сукупність методів, що приводять до отримання генетично ідентичних популяцій організмів.

**Клонування генів** – система методів, що використовують для отримання клонованих ДНК. Містить такі етапи: виділення потрібного гену, убудовування його в плазмід (вектор), уведення вектора в клітину організму-господаря, багаторазову реплікацію.

**Компетенція** – здатність клітини, тканини, органу, організму сприймати індукуючий вплив і специфічно реагувати на нього зміною розвитку.

**Комплементарний ланцюг** – один з ланцюгів ДНК, який використовується як матриця.

**Культура тканин** – вирощування в тривалій пересадковій культурі тканин, що виникли шляхом проліферації клітин ізольованих сегментів різних органів або самих органів рослин.

**Лігування** – утворення фосфодієфірного зв'язку між двома основами одного ланцюга ДНК, які розділені розривом.

**Ліпкий кінець** – вільний одноланцюговий кінець дволанцюгової ДНК, яка комплементарна одноланцюжковою кінцю, що належить цій же або іншій молекулі ДНК.

**Маркер (ДНК)** – фрагмент ДНК відомого розміру, який використовують для калібрування фрагментів у електрофоретичному гелі.

**Маркерний ген** – ген, який ідентифіковано за місцем розташування і такий, що має чіткий фенотипічний прояв.

**Маркування продуктів із ГМО** – нанесення

спеціальних позначок-позначень (символів) на упаковці товарів і продуктів, отриманих з ГМО при їх реалізації.

**Меристема** – освітні тканини з активно діляться клітинами.

**Морфогенез** – процес формування органів (органогенез), тканин (гістогенез) і клітин (цитогенез або клітинне диференціювання).

**Мутагени** – фактори, що збільшують частоту виникнення мутацій у молекулі ДНК.

**Мутація** – спонтанна або індукована зміна в послідовності ДНК, яка в окремих випадках може приводити до появи нових ознак і збереження їх у наступних поколіннях.

**Меристема** – утворююча тканина з недиференційованими клітинами, що активно поділяються.

**Метантенк** – резервуар для отримання з гною та інших органічних відходів в анаеробних умовах.

**Нуклеїнові кислоти** – високомолекулярні природні сполуки (полімери), що складаються з нуклеотидів. Існує два типи нуклеїнових кислот: РНК, ДНК.

**Незамінні амінокислоти** – амінокислоти, які не синтезуються в організмі людини і тварин.

**Нуклеїнові кислоти** – це найбільш високомолекулярні природні сполуки (полімери), які складаються із залишків різних нуклеотидів. Існує два типи нуклеїнових кислот – РНК та ДНК.

**Органогенез** – процес виникнення в неорганізовано зростаючій масі калусних клітин зачатків органів (коренів, листових зачатків і пагонів).

**Плазміда** – кільцева позахромосомних молекула ДНК, здатна до автономної самореплікації.

**Протеїнази, протеази** – ферменти, які приводять до гідролізу білків. Використовують їх при виділенні нуклеїнових кислот для очищення від білків.

**Протопласт** – вміст рослинної клітини, яка позбавлена клітинної стінки за допомогою ферментативного руйнування або механічним способом.

**Профаг** – фаговий геном, інтегрований у бактеріальну

хромосому.

**Рекомбінантна ДНК** – ДНК, що складається з фрагментів ДНК двох або більше організмів.

**Рекомбінантний ген** – ген, послідовність якого складається з фрагментів різних генів.

**Реплікація (редуплікація) ДНК** – самоподвоєння молекули ДНК шляхом утворення її копії за допомогою ДНК-полімераза.

**Рестрикуючі ендонуклеази** – специфічні бактеріальні ферменти, які здатні розщеплювати дволанцюгову молекулу ДНК у певних місцях – сайтах рестрикції.

**Рестрикційний аналіз (маркування)** – визначення розташування на молекулі ДНК сайтів рестрикції рестрикуючими ендонуклеазами.

**РНК** – молекула рибонуклеїнової кислоти, до складу якої належать нуклеотиди, що складаються з азотистих основ (аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу), залишків рибози й залишків фосфорної кислоти.

**РНК-ази** – ферменти, що призводять до руйнування (гідролізу) РНК.

**Сомаклони** – регенеранти рослин, які отримані з соматичних клітин і характеризуються певними відмінностями від вихідних форм.

**Соматична гібридизація** – процес залучення в генетичну рекомбінацію хромосоми і гену ядра та органел поза-сексуального циклу, наприклад, шляхом злиття ізольованих протопластів. Призводить до появи гібридних клітинних ліній і соматичних гібридів рослин.

**Соматичний гібрид** – рослина-регенерант, яка отримана шляхом злиття (гібридизації) соматичних клітин.

**Соматичний ембріогенез** – процес утворення зародкоподібних структур (ембріоїдів) у культурі тканини та клітин.

**Суспензійна культура** – суспензія клітин або їх агрегатів (невеликих груп) у підзв'язаному стані в рідкому середовищі. Вирощують за допомогою апаратури, що забезпечує їх аерацію і перемішування.

**Субкультивування** – перенесення транспланта (інокулюму) в інший культуральний посуд на свіже поживне середовище.

**Технологія глибинної ферментації** – вирощування мікроорганізмів або клітин організмів у рідкому поживному середовищі для отримання продуктів бродіння.

**Технологія твердофазної ферментації** – вирощування мікроорганізмів на твердому поживному середовищі для отримання продуктів бродіння.

**Тотипотентність** – властивість соматичних клітин рослин повністю реалізовувати свою спадкову програму онтогенетичного розвитку з утворенням цілого організму.

**Трансгеноз** – процес перенесення за допомогою різних векторів донорських, сторонніх генів у клітини реципієнтного рослин, тварин і мікроорганізмів.

**Трансгенні, генетично модифіковані організми (ГМО)** – рослини, тварини, мікроорганізми і віруси зі зміненою спадковістю, викликаною вміщенням у їх геном сторонніх генів за допомогою генно-інженерних методів.

**Трансплант (інокулюм)** – частина калусної (суспензійної) культури, яку використовують для пересадки на свіже поживне середовище.

**Тупий кінець** – кінець дволанцюгової молекули ДНК, у якому не постає жоден з ланцюгів.

**Фенотип** – сума зовнішніх ознак організмів, які визначаються генотипом і умовами вирощування.

**Хромосоми** – генетичні структурні утворення клітини, що складаються з ДНК і білків. У хромосомах міститься спадкова інформація організму.

**Цитокініни** – фітогормони, які активізують розвиток меристем, стимулюють утворення бруньок.

**Експлант** – фрагмент тканини або органу, який культивовано на поживному середовищі самостійно або використовується для отримання первинного калусу.

**Експресія гена** – прояв генетичної інформації, яка закодована в гені за допомогою процесів транскрипції і трансляції.

**Електрофорез** – метод розподілу занизкужених молекул (ДНК, РНК або білків), який заснований на різній швидкості їх переміщення в електричному полі.

**Електропорація** – метод перенесення генів у клітини за допомогою електричного розряду, що викликає утворення додаткових пор у клітинній мембрані.

**In vitro** – вирощування живого матеріалу „у пробірці”, на штучних поживних середовищах, у стерильних умовах.

**In vivo** – вирощування живого матеріалу в природних умовах.

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

### Основна:

Биотехнология / Е. С. Воронин. – СПб. : ГИОРД, 2008. – 704 с.

Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988. – 479 с.

Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолоС, 2004. – 296 с.

Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.

Калашникова Е. А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева. – М. : КолоС, 2006. – 144 с.

Мусієнко М. М. Фізіологія рослин / М. М. Мусієнко. – К. : Вища шк., 2001. – С. 348–363.

Мусієнко М. М. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин / М. М. Мусієнко, О. О. Панюта. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 46 с.

Сазыкин Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Изд. центр „Академия”, 2007. – 256 с.

Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.

Катаева Н., Бутенко Р. Клональное микроразмножение растений / Н. Катаева, Р. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 238 с.

### Додаткова:

Березин И. В. Инженерная энзимология / И. В. Березин, А. В. Клесов. – М. : Высш. шк., 1987. – 384 с.

Биотехнология и ее перспективы / И. В. Березин, А. К. Яцимирский. – М. : Знание, 1986. – 64 с.

Биотехнология растений : культура клеток / Г. П. Болвелл, К. Р. Вуд, Р. А. Гонзалес. – М. : Агропромиздат,

1989. – 279 с.

Волиханова Г. Культура клеток и биотехнология растений / Г. Волиханова, И. Рахимбаев. – Алма-Ата, 1989. – 258 с.

Мамедов Н. М. Экология / Н. М. Мамедов, И. Т. Суравегина. – М. : Школа-Пресс, 1996. – С. 437–440.

Пехов А. П. Биология с основами экологии / А. П. Пехов. – СПб. : Лань, 2000. – С. 635–648.

Сельскохозяйственная биотехнология : векторные системы молекулярного клонирования / М. Р. Альтхерр, П. К. Балбас, Р. М. Берка и др. – М. : Агропромиздат, 1991. – 532 с.

Смирнов В. В. Биотехнология : настоящее и будущее / В. В. Смирнов. – К. : Знание, 1986. – 48 с.

## ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

- Биотехнология / Е. С. Воронин . – СПб. : ГИОРД, 2008. – 704 с.
- Биотехнология и ее перспективы / И. В. Березин, А. К. Яцимирский. – М. : Знание, 1986 . – 64 с.
- Биотехнология растений: культура клеток / Г. П. Болвелл, К. Р. Вуд, Р. А. Гонзалес. – М. : Агропромиздат, 1989. – 279 с.
- Биотехнология : принципы и применение / И. Хиггинса. – М. : Мир, 1988 . – 479 с.
- Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолоС, 2004. – 296 с.
- Волиханова Г. Культура клеток и биотехнология растений / Г. Волиханова, И. Рахимбаев. – Алма-Ата, 1989. – 258 с.
- Голубев В. И. Пищевая биотехнология / В. И. Голубев, И. Н. Жиганов. – М. : ДеЛи принт, 2001. – 264 с.
- Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова. – М. : Академия, 2003. – 398 с.
- Мамедов Н. М. Экология / Н. М. Мамедов, И. Т. Суравегина. – М. : Школа-Пресс, 1996. – С. 437–440.
- Мусієнко М. М. Фізіологія рослин / М. М. Мусієнко. – К. : Вища шк., 2001. – С. 348–363.
- Мусієнко М. М. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин / М. М. Мусієнко, О.О. Панюта. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 46 с.
- Пехов А.П. Биология с основами экологии / А. П. Пехов. – СПб. : Лань, 2000. – С. 635–648.
- Сазыкин Ю. О. Биотехнология / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. – М. : Изд. центр „Академія”, 2007. – 256 с.
- Смирнов В. В. Биотехнология : настоящее и будущее / В. В.Смирнов. – К. : Знание, 1986. – 48 с.



Навчальне видання

**МАЦАЙ** Наталія Юріївна

# **ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

*Підручник  
для студентів освітнього рівня бакалавр  
спеціальності «Біологія»*

За редакцією автора  
Комп'ютерний макет – Мацай Н. Ю.  
Коректор – Лесовець Н. М.

---

Здано до склад. 02.02.2011 р. Підп. до друку 02.03.2011 р.  
Формат 60x84 1/16. Папір офсет. Гарнітура Times New Roman.  
Друк ризографічний. Ум. друк. арк. 8,89. Наклад 100 прим. Зам. №57.

**Видавець і виготовлювач**  
**Видавництво Державного закладу**  
**«Луганський національний університет імені Тараса Шевченка»**  
вул. Оборонна, 2, м. Луганськ, 91011. Тел./факс: (0642) 58-03-20  
e-mail: [alma-mater@list.ru](mailto:alma-mater@list.ru)

*Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3459 від 09.04.2009 р.*

# **ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ**