

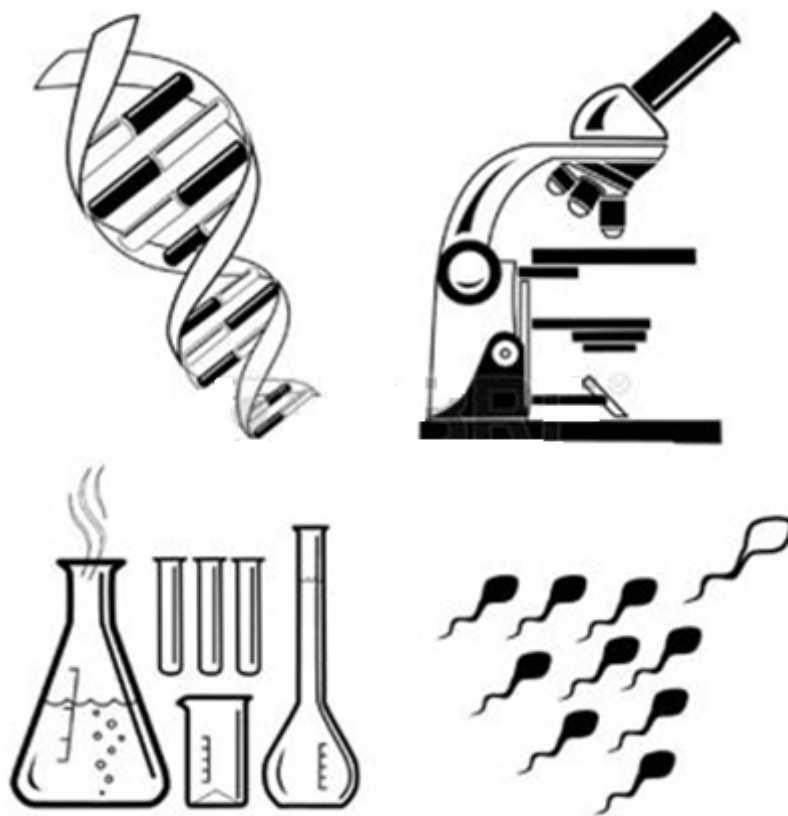
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

БІОТЕХНОЛОГІЯ

**методичні рекомендації для самостійного вивчення дисципліни
студентами денної та заочної форми навчання ступеня вищої
освіти «Бакалавр» освітньої спеціальності 204 – «Технологія
виробництва і переробки продукції тваринництва»**



УДК 636.082.2
ББК 30.16
Б63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “26” 03.2016р., протокол № 7.

Укладач:

О. І. Юлевич – доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцент

Рецензенти:

С. І. Ковтун – заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин НААН, д-р с.-г. наук, професор, член-кореспондент НААН

С. П. Кот – завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету, канд. біол. наук, доцент

З М І С Т

Вступ	4
1. Способи отримання генів	5
2. Ампліфікація ділянок ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	9
3. Транспозони, види транспозицій	12
4. Трансгенні риби	17
5. Трансгенні птахи	22
6. Біотехнологічна інтенсифікація процесів рубцевого травлення жуйних	27
7. Генно-модифіковані організми (ГМО) і біобезпека	32
7.1. ГМО, агрономічно важливі характеристики рослин; змінені поживні властивості та склад ГМ-продуктів	32
7.2. Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО	36
8. Ферменти харчової промисловості. Продукти, що отримують за допомогою іммобілізованих ферментів	38
9. Мікроорганізми в якості контролю забруднення. Біотехнологічна деградація нафтових забруднень	43
10. Біотехнологія і енергетика	47
Список використаної літератури	52

ВСТУП

Якісною характеристикою сучасної біотехнології є тандем власне передової науки і технологічних підходів, що забезпечує оптимізацію виробничих процесів з метою отримання чистої продукції і одночасного збереження глобального навколишнього середовища. У виробничих процесах біотехнології використовуються досягнення таких галузей науки, як геноміка мікроорганізмів і біоінформатика, інженерна ензимологія і моделювання, біокаталіз і дизайн його процесів та ін.

Для сучасної біотехнології характерний комплексний підхід, широке використання досягнень і методів не лише молекулярної біології та генної інженерії, але також і хімії, фізики, біоінформатики. Біотехнологія – міждисциплінарна наука. В останні роки саме міждисциплінарні дослідження набувають зростаючого значення, оскільки вони пов'язані з новими проривами в науці. У зв'язку з цим, останнім часом як окремий напрямок досліджень розглядається створення єдиних технологічних платформ для проведення широкого спектру досліджень. Разом з тим, традиційно, залежно від сфери застосування виділяють «червону» (медичну), «білу» (промислову) і «зелену» (сільськогосподарську) біотехнологію.

«Червона» біотехнологія пов'язана із забезпеченням здоров'я людини і потенційною корекцією її генома, з виробництвом біофармацевтичних препаратів і медичною діагностикою.

«Біла» біотехнологія – пов'язана з використанням поновлюваних джерел біомаси (рослини, водорості, гриби, ресурси лісів і океанів, мікроорганізми та ін.) для цілей сталого промислового виробництва і зниження шкідливого впливу на навколишнє середовище. За допомогою сучасних методів і проривних технологій біологічні ресурси переробляються для отримання і подальшої трансформації біопродуктів, хімічних сполук і енергії.

«Зелена» біотехнологія – включає в себе агробіотехнології, створення генетично модифікованих (ГМ) рослин з подальшим їх використанням в харчовій, хімічній промисловості, а також у виробництві біопалива.

Сучасні актуальні проблеми, що стоять перед людством, а саме: нестача продовольства, виникнення нових і особливо небезпечних для здоров'я людини захворювань, нестача енергетичних ресурсів для росту національних економік, проблеми біобезпеки та забруднення навколишнього середовища, є об'єктивною передумовою того, що у XXI столітті біотехнологія стане одним з визначальних чинників соціально-економічного розвитку держав. Використання досягнень біотехнології призводить не лише до створення нових продуктів і послуг, але і до принципових структурних зрушень в економіці і соціальному житті.

1. Способи отримання генів

Розрізняють декілька методів отримання генів:

- хімічний синтез;
- виділення генів з ДНК – рестрикційний метод;
- ферментативний синтез, за допомогою ферменту генетичної інженерії – зворотної транскриптази, або ревертази;
- хіміко-ферментативний синтез;
- отримання фрагментів ДНК, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Хімічний синтез. Знаючи первинну структуру білка і його генетичний код, можна скласти послідовність нуклеотидів у гені заданого білка, а потім синтезувати його. У цей спосіб можна одержати невеликі гени довжиною до двох десятків кодонів. Перший ген було синтезовано у 1969 р. групою Х.Корани. Ген аланінової тРНК дріжджів вони одержали шляхом сполучення синтетичних дрібних фрагментів (від 4 до 13 пар нуклеотидів) у необхідному порядку за допомогою ферменту ДНК-лігази. В одержаному гені бракувало регуляторних ділянок, тому він був функціонально неактивним. У 1976 р. Х.Корана і співробітники синтезували фрагмент ДНК кишкової палички, який кодував тирозинову тРНК, але до його кінців вони приєднали гібридні затравки – тетрануклеотиди ААТТ і ТТАА. Синтезований ген виявився повністю активним. При введенні його в мутантний штам бактеріофага Т4, у котрому цього гена бракувало, бактеріофаг добре розмножувався в клітинах кишкової палички, тобто ставав повноцінним. Група Г.Бойера здійснила хімічний синтез гена гормону соматостатину і ввела його в лактозний оперон кишкової палички поруч із геном β -галактозидази (лактази). У результаті бактерія почала виробляти білок, у якому одна частина була β -галактозидазою, а друга – соматостатином. Отже, транскрипція і трансляція цього гібрида здійснювалася за рахунок використання відповідних регуляторних послідовностей β -галактозидази. Надалі соматостатин було виділено у вигляді пептиду. Ці блискучі експерименти показали можливість створення хімічним шляхом генів, які не відрізняються від природних.

Виділення генів з ДНК – рестрикційний метод. Отримання генів за допомогою специфічних ендонуклеаз – рестриктаз. Ці ферменти відкриті в 1953 р. у бактерій. За допомогою рестриктаз розщеплюють ДНК бактерій іншого штаму або клітини-господаря. До теперішнього часу з різних мікроорганізмів виділено понад тисячі різних рестриктаз; в генетичній інженерії використовується близько 200.

Рестриктази гідролізують ДНК строго по певних специфічних послідовностях, так званих *сайтах рестрикції*. Кожна з рестриктаз розпізнає свій сайт рестрикції і розрізає ДНК або всередині сайту, або в безпосередній близькості від нього. Позначення рестриктаз складається з початкових літер латинської назви виду бактерії, з якої виділено фермент, і додаткового позначення, оскільки з бактерій одного виду може бути виділено декілька

різних рестриктаз: *Escherichia coli* – *Eco RI*, *Eco RV*; *Thermus aquaticus* – *TaqI*.

З декількох типів рестриктаз у генній інженерії часто використовуються рестриктази двох типів, які розпізнають певну послідовність ДНК і гідролізують її всередині послідовності сайту рестрикції. Однак рестриктази не «вирізують» повністю ген і його потрібно або добудувати хімічним шляхом, або відщеплювати зайві нуклеотидні послідовності. Тому цей метод виділення генів з ДНК має *недоліки*:

1. Досить важко підібрати рестриктази, що дозволяють вирізати з ДНК саме ту ділянку, яка відповідає певному гену. Разом із геном, який потрібен, отримані фрагменти ДНК, як правило, включають зайві нуклеотидні послідовності, що заважають використанню гена. Рестриктаза може відщепити частину нуклеотидної послідовності гена, в результаті ген втрачає функціональну повноцінність.

2. Гени еукаріот мають складну будову: включають екзони та інтрони. Первинна РНК, синтезована на такій ДНК-матриці, піддається модифікації (*сплайсингу*), в результаті ділянки, що відповідають інтронам, відокремлюються, а ділянки, що відповідають ексонам, з'єднуються, утворюють *зрілу матричну РНК (мРНК)*. Наявність інтронів є перешкодою для нормального функціонування трансплантованих генів.

3. При обробці ДНК рестриктазами утворюється суміш фрагментів. Виділити з неї фрагменти, що несуть потрібний ген – складне завдання. Бактеріальна клітина містить близько 5 тис. генів, проте еукаріотична клітина – від 10 до 200 тис. генів.

Ферментативний синтез.

У подальших дослідженнях із синтезу генів почали застосовувати менш трудомісткий і швидший метод – синтез за участю ферменту зворотної транскриптази (ревертази). Цей фермент наявний у деяких РНК-вірусів, у яких генетична інформація зберігається не в ДНК, а в РНК. При вивченні цього ферменту було з'ясовано, що матрицею для утворення ДНК може служити навіть синтетична мРНК. Це відкривало нові шляхи для синтезу різноманітних генів за допомогою матричної РНК. Якщо *in vitro* у спеціальну інкубаційну суміш додати певну мРНК (наприклад, мРНК проінсуліну), то синтезується ген, комплементарний саме цій мРНК, у якому закодована структура відповідного білка (проінсуліну). На мРНК ревертаза синтезує комплементарну їй ДНК-копію (кДНК). Тому роботу починають із виділення та очищення потрібної мРНК із суміші багатьох різних мРНК. Для цього використовуються спеціалізовані клітини, які продукують переважно певний різновид білка. Наприклад, із ретикулоцитів – незрілих кров'яних клітин, у яких міститься багато гемоглобіну (90% від усіх білків), виділяють мРНК для одержання α - і β -поліпептидних ланцюгів гемоглобіну, з клітин інсуліноми – пухлини β -клітин підшлункової залози, виділяють мРНК проінсуліну, із лейкоцитів – мРНК інтерферону і т.ін. Клітини руйнують, збирають центрифугуванням рибосоми (полісоми), оброблюють їх антитілами проти

того білка, ген якого прагнуть здобути. Білок, який нас зацікавив, але ще прикріплений до полісом, що синтезують його на матриці мРНК, взаємодіючи зі специфічними антитілами, випадає в осад. Специфічні мРНК, на яких синтезувався білок, можна потім вилучити з осаду за допомогою хроматографічних методів практично в чистому вигляді, тобто без домішок інших мРНК. Тепер одержану специфічну мРНК використовують як матрицю для ферментативного синтезу кДНК за допомогою ревертази. Для початку реакції синтезу ДНК-ревертазою потрібний «запал» у вигляді невеликого дволанцюжкового відрізка. Цю функцію виконують короткі олігонуклеотиди з 18-20 тимінових залишків (полі-Т), які з'єднуються за принципом комплементарності з полі-А-последовністю мРНК. В результаті утворюється гібридна мРНК-кДНК молекула, причому на кінці у неї буде синтезуватися короткий відрізок дволанцюжкової ДНК – *шпилька*. Шпилька служить запалом для синтезу другого комплементарного ланцюга ДНК, що здійснюється вже ферментом ДНК-полімеразою (рис. 1). В утвореному гібриді мРНК-кДНК усувається ланцюг мРНК за допомогою ферментів РНКаз, і на одноланцюговій кДНК за допомогою ДНК-полімерази І добудовується другий ланцюг кДНК. У результаті утворюється дволанцюгова кДНК, яка потім з'єднується з необхідним вектором.

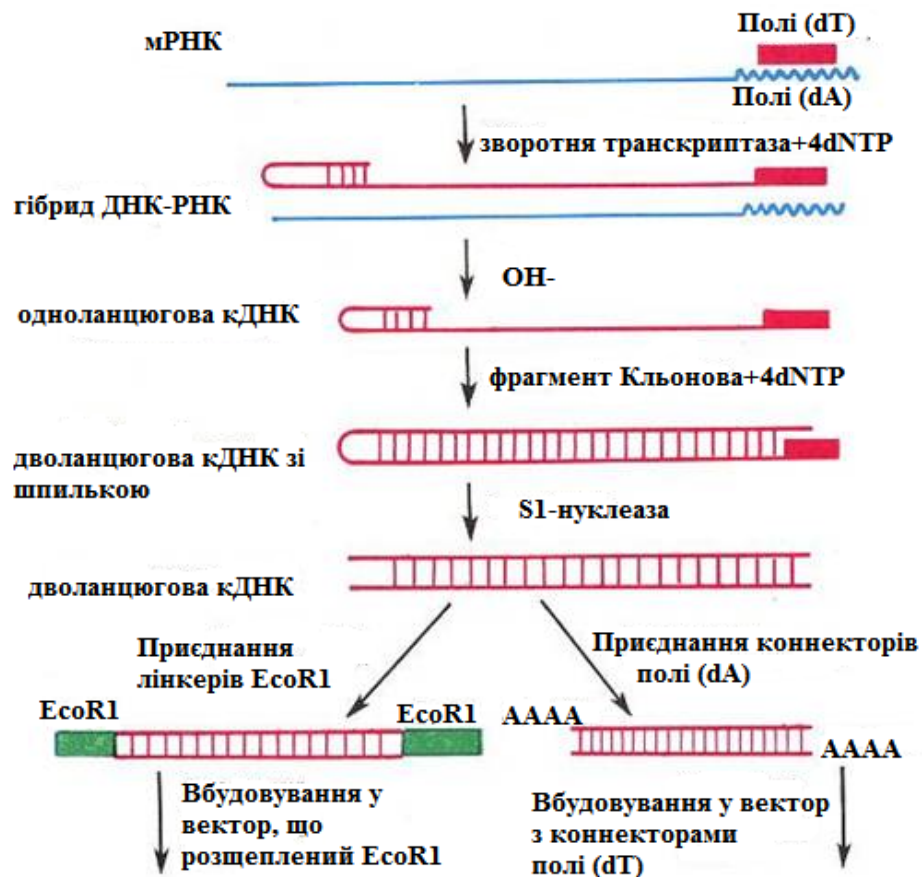


Рис. 1. Конструювання дволанцюгової кДНК на основі мРНК; 4dNTP - чотири види нуклеотидів

У лабораторіях різних країн цим способом були синтезовані гени, які кодуєть білки людини, кроля, миші, гени вірусу віспи, деяких бактеріофагів і т. ін. Однак необхідно враховувати, що при використанні мРНК як матриці для синтезу ДНК утворюється не весь ген з регуляторними ділянками, а тільки його структурна інформаційна частина. Тому ще складнішим завданням є виділення готового гена з генома клітини. Це пов'язано з тим, що на частку кожного гена припадає лише невелика частина всього генома і, крім того, багато генів еукаріот побудовані складно – іноді вони складаються з ряду окремих ділянок, розташованих на різних ділянках генома. Тому всю клітинну ДНК розщеплюють на фрагменти за допомогою обробки рестриктазами, багато з яких дають дволанцюгові розриви тільки в обмежених ділянках ДНК.

Хіміко-ферментативний синтез. Цей метод є альтернативою "вирізанню" генів за допомогою рестриктаз з нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8-16-фрагментів) одноланцюгових фрагментів ДНК (олігонуклеотидів) за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігази з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів. Хіміко-ферментативний синтез дозволяє точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів. Крім того, існує можливість уведення в гени ділянок розпізнання різних рестриктаз, регуляторних послідовностей. Хімічним шляхом синтезують олігонуклеотиди: лінкер, адаптери, праймери, промотори, а гени синтезують ферментативним методом.

Лінкер (англ. «*link*» – з'єднувати) – короткий дволанцюговий олігонуклеотид, що містить сайти розпізнання для ряду рестриктаз.

Адаптери – це лінкери, що містять більше одного сайту впізнавання рестриктазою, він призначений для з'єднання фрагментів з несумісними кінцями.

Праймери – короткі одноланцюгові фрагменти, комплементарні початку або кінцю гена.

Промотор (80...10 нуклеотидів) – фрагмент ДНК, що розпізнається РНК-полімеразою.

Застосування цього методу обмежене можливостями отримання інформації про нуклеотидну послідовність гена. Ця послідовність може бути відтворена на основі первинної структури відповідного білка. Методом хіміко-ферментативного синтезу отримано гени соматостатину, А- і В-ланцюги інсуліну, проінсуліну та ін.

Отримання фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Чисельні (ампліфіковані у мільйон разів) копії певних фрагментів ДНК отримують *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яку поширено використовують у наш час. Вперше її запропонували у 1985 році Р.К.Сейки, С.Шарф, Ф.Фалуна, К.Б.Мулліс, Г.Е.Хорн, Х.А.Ерліх і Н.Арнхейм. ПЛР високо специфічна і чутлива, за її допомогою можна виявити, розмножити і дослідити навіть одиничну копію

гена у вихідному матеріалі. Зазвичай 30 циклів ампліфікації протікає протягом трьох годин.

Питання для самоперевірки

1. Які існують методи отримання генів?
2. В чому полягають недоліки рестрикційного методу отримання генів?
3. На використанні якого ферменту заснований ферментативний метод отримання генів?
4. Для синтезу яких олігонуклеотидів використовується хіміко-ферментативний метод отримання генів?

2. Ампліфікація ділянок ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Альтернативним і додатковим до клонування методом збільшення кількості бажаного фрагмента ДНК (ампліфікації) є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, або PCR (Polymerase Chain Reaction)). ПЛР – це реакція синтезу ДНК *in vitro*, яка повторюється багато разів: синтезовані ланцюги стають матрицями для синтезу в наступному циклі реакції. Для здійснення ПЛР треба знати принаймні короткі послідовності ДНК на кінцях того фрагмента, що має бути ампліфікований.

На початку 1970-х років норвезькому вченому Хьеллю Клеппе з лабораторії Нобелівського лауреата Хара Гобінди Хорани прийшла в голову думка, що можна ампліфікувати ДНК за допомогою пари коротких одноланцюгових молекул ДНК – синтетичних праймерів. Проте у той час ця ідея залишилася незатребуваною. Полімеразна ланцюгова реакція була знову відкрита в 1983 році Кірі Маллісом. Його метою було створення методу, який би дозволив ампліфікувати ДНК в ході багатократних послідовних подвоєнь початкової молекули ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Через 7 років після публікації цієї ідеї, в 1993 р., Малліс отримав за неї Нобелівську премію.

Процедура була дуже неефективною, вимагала багато часу і ферменту, оскільки після кожного циклу нагрівання-охолодження доводилося додавати в реакційну суміш ДНК-полімерази, тому що вона швидко інактивувалася при високій температурі, необхідній для розподілення ланцюгів спіралі ДНК. У 1986 році метод полімеразної ланцюгової реакції був істотно поліпшений. Було запропоновано використовувати ДНК-полімерази з термофільних бактерій. Ці ферменти виявилися термостабільними і були здатні витримувати безліч циклів реакції. Їх використання дозволило спростити і автоматизувати проведення ПЛР. Одна з перших термостабільних ДНК-полімераз була виділена з бактерій *Thermus aquaticus* і названа *Taq*-полімераза. Недолік цієї полімерази полягає в тому, що вірогідність внесення помилкового нуклеотиду у неї досить висока, оскільки у цього ферменту

відсутні механізми виправлення помилок (3'→5' екзонуклеазна активність). Полімерази *Pfu* і *Pwo*, виділені з архей, мають такий механізм, їх використання значно зменшує число мутацій в ДНК, але швидкість їх роботи (процесивність) нижча, ніж у *Taq*. Зараз застосовують суміші *Taq* і *Pfu*, щоб добитися одночасно високої швидкості полімеризації і високої точності копіювання.

Типова ПЛР-ампліфікація складається з багаторазового повторення наступних реакцій.

1. *Денатурація*. Перший етап ПЛР полягає у тепловій денатурації зразка ДНК шляхом витримання його при температурі 95°C протягом принаймні 1 хв. Крім ДНК, в реакційній суміші міститься надлишок двох праймерів, термостабільна ДНК-полімераза *Taq*, що виділена з бактерій *Thermus aquaticus*, і чотири дезоксирибонуклеотида.

2. *Ренатурація (відпал)*. Температуру суміші повільно знижують ~ до 55°C, при цьому праймери з'єднуються із комплементарними послідовностями ДНК.

3. *Синтез*. Температуру підвищують до ~ 75°C – величини, оптимальної для ДНК-полімерази *Taq*. Починається синтез комплементарного ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера (рис. 2).

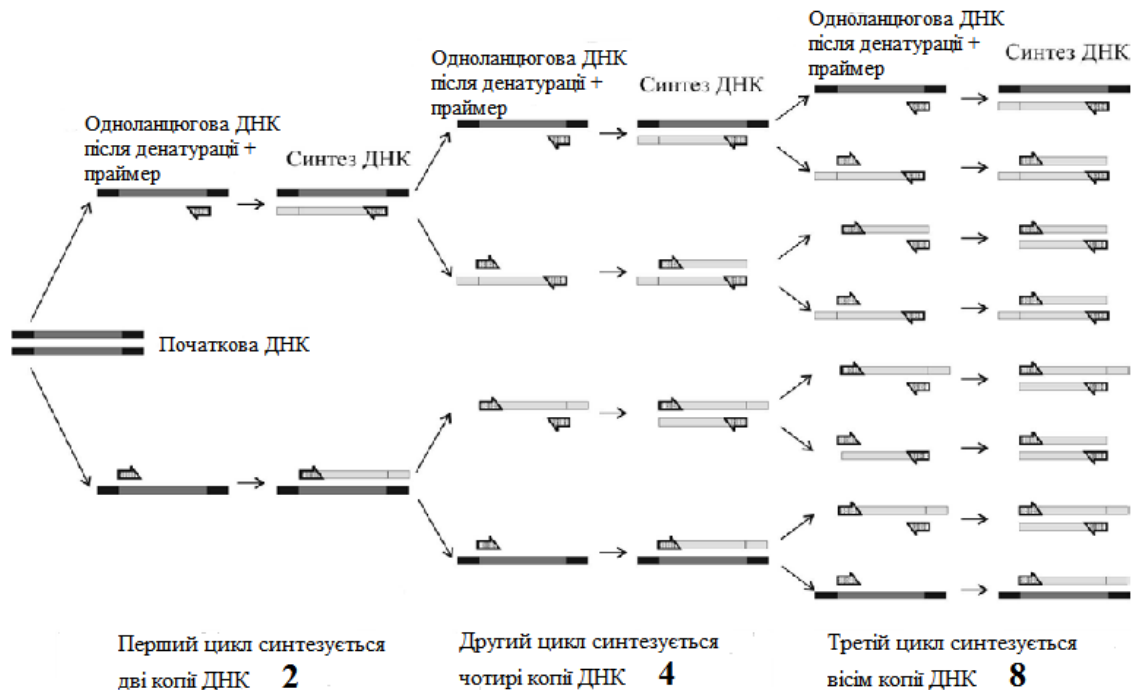


Рис. 2. Схема реакції ПЛР

У першому циклі після денатурації ДНК і зв'язування із нею праймерів, ДНК-полімераза створює дволанцюгові структури, в яких батьківські ланцюги ДНК поєднані зі знов синтезованими комплементарними ланцюгами різної довжини, але із фіксованим 5'-закінченням. Уже у другому

циклі створюються два ланцюги специфічної послідовності, що мають задані розміри. У третьому циклі ці ланцюги дають початок дволанцюговим детермінованим за розміром фрагментам ДНК. У кожному наступному циклі їх кількість подвоюється, і теоретично досягає у 22 циклі, а на практиці – у 30 циклі більше мільйона копій. Вихідні молекули ДНК і структури, що утворилися у першому циклі, присутні в реакційній суміші наприкінці ПЛР у незначній кількості.

Для здійснення ПЛР необхідно знати послідовність як найменш 17 п.н. з обох боків дослідного фрагменту ДНК. Зазвичай синтезують два дезоксинуклеотиди довжиною 20-30 основ, які являють собою кінцеві послідовності фрагменту ДНК, що нас цікавить. Використовуючи комплементарні до цих ділянок олігомери – праймери, запускають *ампліфікацію* (процес збільшення копій гена). Надлишкову кількість праймерів змішують з геномною ДНК, а потім послідовно здійснюють реакції денатурації, відпалу (ренатурації) і нарощування ланцюга (подовження праймера). Теплова денатурація супроводжується розплітанням подвійної спіралі ДНК. При зниженні температури має місце відпал олігонуклеотидів, тобто здійснюється гібридизація олігонуклеотидних праймерів зі своїми комплементарними послідовностями. Ріст ланцюга праймерів каталізує ДНК-полімерза в присутності дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, і в результаті добудовується новий комплементарний ланцюг ДНК.

При повторних циклах теплової денатурації, відпалу і синтезу нові ланцюги ДНК, що створилися, виступають у якості шаблонів (матриць) для праймерів, що викликає експоненціальне нарощування ділянки ДНК, обмеженої праймерами, що входять до складу цих фрагментів.

Для здійснення ПЛР (рис. 3) необхідно:

- два синтетичних олігонуклеотидних *праймери* (короткі олігонуклеотиди, які гібридизуються із матрицею і слугують запалом при її копіюванні) довжиною приблизно 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів, що *фланкують* (оточують) послідовність-мішень, яку розмножують; їх 3'-гідроксильні кінці після *відпалу* (процес утворення дволанцюгових молекул (ДНК-ДНК або ДНК-РНК) з одностанцюгових полінуклеотидних комплементарних ланцюгів) з ДНК повинні бути орієнтовані назустріч один одному;

- ДНК-матриця довжиною від 100 до ~ 35 000 п.н.;
- термостабільна ДНК-полімераза, яка не втрачає активність при температурі 95°C і вище;
- чотири дезоксирибонуклеотиди (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- іони Mg^{2+} , що необхідні для роботи полімерази.

Буферний розчин, що забезпечує відповідні умови реакції – рН, іонну силу розчину. Містить солі, бичачий сироватковий альбумін.



Рис. 3. Вихідні компоненти ПЛР

Метод ПЛР має надзвичайно широке застосування. Ним послуговуються кожного разу, коли є необхідність детектувати й дослідити невелику кількість ДНК, у тому числі, у складі неочищеного біологічного матеріалу. ПЛР застосовують також у комбінації з клонуванням: ампліфікований ДНК-продукт можна клонувати й використати, наприклад, для експресії білка; ампліфікація за допомогою ПЛР стає в пригоді для збільшення невеликої кількості клонованої ДНК.

В даний час ПЛР широко використовується в наукових і діагностичних лабораторіях в багатьох галузях. Крім простого подвоєння послідовностей ДНК, метод ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК), клонування будь-яких послідовностей в пробірці, виділення нових генів, секвенування. Також ПЛР широко використовується в біологічній і медичній практиці, в першу чергу, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, ступеня споріднення, популяційних досліджень, в криміналістиці – скрізь, де потрібно встановити унікальну послідовність ДНК, спираючись на мінімальну кількість вихідного матеріалу, що її містить.

Питання для самоперевірки

1. З яких реакцій складається ПЛР-ампліфікація?
2. Які компоненти необхідні для здійснення ПЛР?
3. Чому для здійснення ПЛР необхідно використовувати два праймери, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів?
4. Вкажіть напрями застосування ПЛР.

3. Транспозони, види транспозицій

Транспозон – послідовність ДНК, що здатна переміщуватися, реплікуватися і вбудовувати одну з копій у нове місце генома в результаті процесу, званого транспозицією. Транспозони – один з класів мобільних елементів геному, що мають довжину близько 2500-7000 н.п., які,

вбудовуючись у геном, можуть викликати мутації, в тому числі і такі значні як хромосомні перебудови.

Вперше транспозони були відкриті в 40-х роках ХХ століття Барбарою Мак-Клінтон в зернах індіанського зерна (червоної кукурудзи). До 1970 року вони були виявлені майже у всіх живих організмів – від бактерій до черв'яків і плодових мушок дрозофіл.

Рекомбінації, що пов'язані з переміщенням транспозонів, отримали назву «транспозиції». Транспозиції можуть бути спрямованими й неспрямованими. При спрямованій транспозиції переміщення транспозонів може відбуватися у суворо визначений сайт, а при неспрямованій транспозиції – в будь-яку ділянку геному. Переміщення транспозонів називають «незаконною рекомбінацією», оскільки воно практично не залежить від системи генів *Rec ABC*. Остання зазвичай забезпечує рекомбінації в клітині. Ще однією відмінною рисою «незаконної транспозиції» є те, що вона відбувається за участю особливого ферменту – транспозази. Хоча по суті механізму транспозиції є рекомбінаціями, вони супроводжуються також і різними мутаціями, серед яких найбільш часто відбуваються випадання ділянок хромосом (делеції), вставки (інсерції), повороти фрагментів ДНК (інверсії), і навіть великі генетичні перебудови (транслокації).

Розрізняють два класи транспозонів:

Клас 1 включає ретротранспозони, що переміщуються по геному шляхом зворотної транскрипції з їх РНК;

Клас 2 – ДНК-транспозони, що переміщуються шляхом прямого вирізання та вставки. Головна відмінність транспозонів другого типу від ретротранспозонів полягає в тому, що механізм їх транспозиції не включає стадію РНК-інтермедіата (посередника). Транспозони другого типу переміщуються за механізмом «вирізати – вставити», але не «копіювати – вставити», і використовують при цьому фермент транспозази. Транспозаза – це фермент, що зв'язує одноланцюгову ДНК і вбудовує останню в геномну ДНК. Транспозони класу 2 кодують транспозазу, яка дозволяє транспозону бути вирізаним з геномної ДНК і вбудованим в інші місце.

Транспозони переміщуються за участю комплексу білків, що підтримує активність ферменту транспозази, яка розпізнає елемент і забезпечує його перенесення на нове місце.

Транспозони обмежені з двох боків так званими «інвертованими повторами», тобто спрямованими назустріч одна одній послідовностями. Інвертовані повтори необхідні для переміщення елемента, яке здійснюється завдяки їхньому зближенню один з одним і розпізнаванню транспозази. Інвертовані повтори зближуються і точно відрізаються від сусідніх ділянок ДНК господаря. Успішному вирізанню елемента сприяє додаткова надспіралізація дволанцюгової спіралі ДНК, що забезпечує вигини подвійної спіралі і зближення окремих її ділянок. Вирізаний транспозон вбудовується у район внесеного транспозазою розриву в молекулі-мішені і зшивається з

ДНК господаря в новому місці. Розрив і зашивання здійснюються транспозазою і допоміжними білками. Рухливість елементів стає можливою завдяки активності ферментів, які здатні точно вирізати елемент з хромосоми для того, щоб потім вставити його в якесь інше місце генома. А пролом в ДНК, що залишився після вирізання транспозона, може заліковуватися – забудовуватися за участю гомологічної ділянки, наприклад сестринської молекули ДНК, тільки що редукованої.

Залежно від того реплікується чи ні мобільний елемент розрізняють два механізми транспозицій (рис.4).

У разі *консервативного типу транспозиції* елемент переміщується з одного сайту на інший. Процес транспозиції (який, по суті, є одним з варіантів сайт-специфічної рекомбінації) залишає дволанцюговий розрив у місці, де знаходився транспозон.

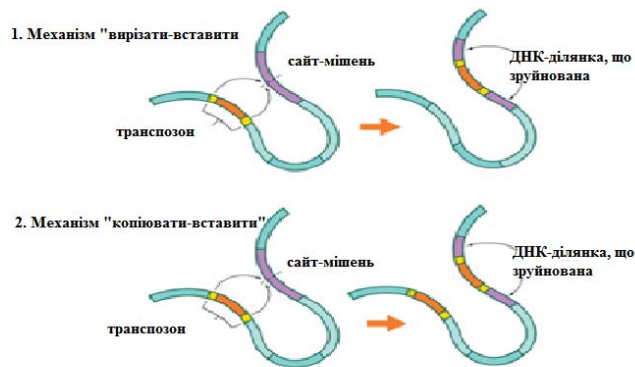


Рис. 4. Два механізми транспозиції: 1. За механізмом «вирізати - вставити»; 2. За механізмом «копіювати - вставити»

У випадку незалежної від реплікації транспозиції (нереплікативна – консервативна транспозиція), цій розрив піддається репарації за механізмом негомологічного з'єднання кінців, тобто транспозон просто «стрибає» в інше місце (рис. 5).

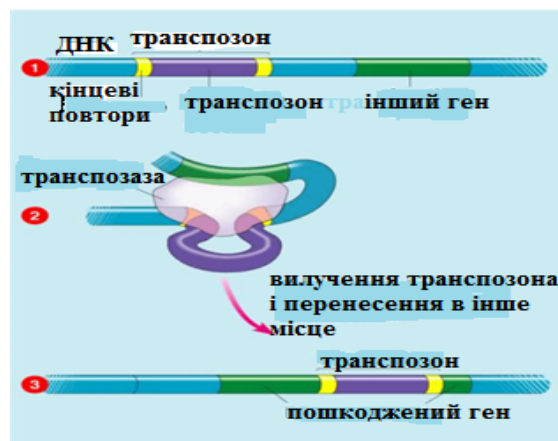


Рис. 5. Механізм здійснення консервативної транспозиції

Але й досить часто транспозиція відбувається під час реплікації (*реплікативна транспозиція*) – тоді розріз репарується за рекомбінаційним механізмом: сестринська молекула ДНК використовується як матриця, ділянка, що містила транспозон, відновлюється – транспозон розмножується (рис. 6). Процес каталізується білком ресольвазою (сайт-специфічна рекомбінація).

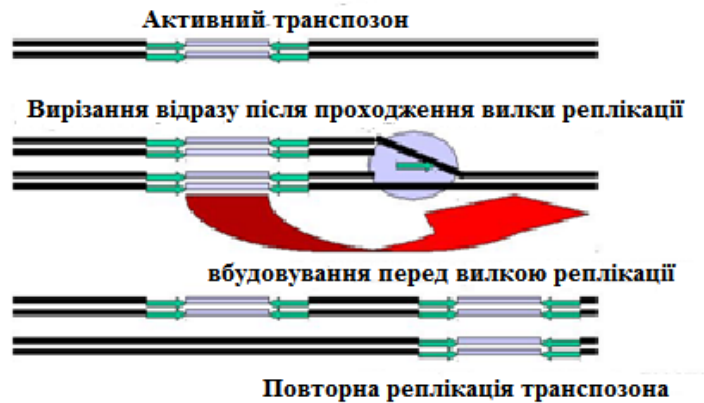


Рис. 6. Реплікативна транспозиція: синхронізація із реплікацією ДНК

Реплікативна (*репаративна*) транспозиція може здійснюватися іншим чином – транспозон не вирізується з локусу, в якому він розташований. Замість цього реплікон-донор і реплікон-реципієнт створюють коінтегра́т (об'єднуються один з одним), у процесі формування якого виникає друга копія транспозону. Внаслідок наступного за цим поділу репліконів, кожний з них стає власником копії вихідного транспозону (рис. 7).

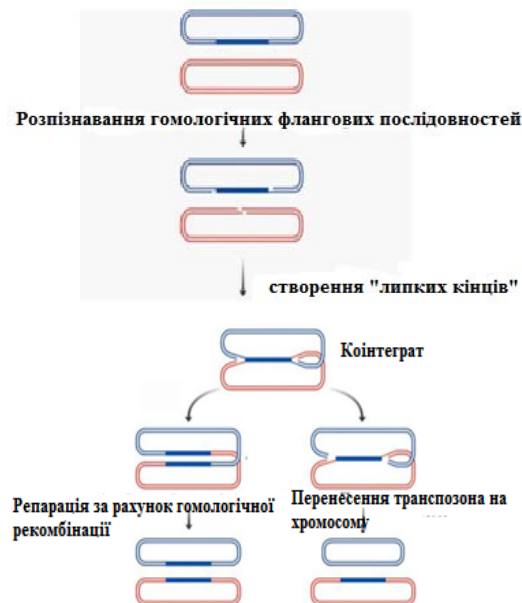


Рис.7. Репаративна транспозиція: конверсія за рахунок гомологічної рекомбінації

При ретропозиції ДНК спочатку транскрибується в РНК, яка виступає в якості матриці для синтезу кДНК в процесі зворотної транскрипції. На відміну від ДНК-опосередкованого переносу, ретропозиція завжди є дуплікативною (рис. 8).



Рис. 8. Механізм ретропозиції (перенесена копія фланкується короткими повторами)

Коли транспозиційний елемент інтегрується в геном, невелика ділянка ДНК в точці вбудовування (зазвичай 4-12 н.п.) дуплікується. Дупліковані повтори мають однакову орієнтацію і називаються прямими повторами. Це своєрідна "візитна картка" транспозиції і ретропозиції.

Оскільки рухливі гени можуть переміщатися в межах геному з одного місця на інше, то вони можуть бути дуже ефективними векторами для передачі рекомбінантної ДНК.

Генетична трансформація за допомогою векторів на основі транспозонів була вперше здійснена на дрозофілі. За допомогою мобільного елемента *P* дрозофіли був переданий ген, який зумовлює коричневе забарвлення очей. Перенесення генів за допомогою транспозонів має великі переваги, оскільки воно відбувається з високою частотою і не викликає значних перебудов інтегрованої ДНК. Крім того, цим методом можна переносити досить великі фрагменти ДНК.

Питання для самоперевірки

1. Що таке «транспозон»?
2. Чому переміщення транспозонів називають «незаконною рекомбінацією»?
3. Які класи транспозонів розрізняють?
4. Які існують механізми транспозицій?
5. За яким механізмом відбувається консервативна транспозиція?
6. В чому полягає різниця між реплікативною і репаративною транспозиціями?
7. В чому полягає особливість ретропозиції?

4. Трансгенні риби

Трансгенез – це технологія генної інженерії, при якій ізольована послідовність генів одного організму поміщується в інший організм для передачі нової або модифікованої ознаки. Така ізольована послідовність генів називається «структурою» і складається з функціонального гена і гена-промотора, який діє як перемикач для активації функціонального гена. Організми, отримані в результаті успішного трансгенезу, класифікуються як генномодифіковані організми (ГМО).

Трансгенез був основною темою досліджень в генетиці риб з початку 1990-х років. Дослідження в цій галузі розвинуті більше, ніж в інших видах тваринництва з причини відносної простоти маніпуляцій в репродуктивній біології водних видів. Індукція трансгенезу повинна включати ряд етапів:

- ідентифікація бажаного цільового гена і розробка структури;
- уведення гена в запліднені яйцеклітини, звичайно з використанням мікроін'єкцій або шляхом застосування електропорації;
- визначення інкорпорації (*приєднання*) трансгена в геном господаря;
- визначення експресії трансгена;
- визначення успадкованого трансгена і квантифікація (*вимірювання якісних ознак у кількісному вираженні*) ефекту трансгена на цільові та нецільові ознаки.

Останній етап зі згаданих тут у край важливий, оскільки він необхідний для повної характеристики властивостей трансгенної риби, щоб оцінити потенційні ризики, пов'язані з її розведенням.

Згадані вище фази розвитку були успішно застосовані до кількох видів риб, і були отримані трансгенні лінії з досить високими показниками росту. Зрозуміло, що трансгенез потенційно може приводити до швидких змін в господарсько-цінних ознаках, але для планування та проведення таких досліджень важливо знати про можливі ризики.

У 90-х роках минулого століття *Zhiyuan Gong*, професор Сінгапурського національного університету, почав досліди, при яких в ікринки риб вводилася рідина, що містить гени морського анемона. Так почалися роботи, які привели до створення акваріумних рибок, що світяться. Відпрацьовувалася техніка пересадки в геном риб чужого гена (трансгена) і з'ясовувалося як зробити його конструкцію такою, щоб організм нового господаря почав активно синтезувати чужорідний білок, структура якого закодована у "підсадженому" гені. Ці дослідження можна було б помітно прискорити, якщо пересаджувати ген, що кодує нетоксичний білок, який легко виявляється, синтез якого можливий вже на самих ранніх стадіях ембріонального розвитку трансгенного організму. І такі гени дійсно були виділені спочатку з медузи (*Aequorea victoria*) – ген, що кодує зелений флуоресцентний білок (*green fluorescent protein*, або *GFP*), і трохи пізніше, з

морського анемона (*Discosoma sp.*) – ген, що кодує червоний флуоресцентний білок (*red fluorescent protein*, або *RFP*). Ці гени стали широко використовуватися для вдосконалення трансгенних технологій і в ембріологічних дослідженнях.

Виявилося, що даніо реріо (*Brachydanio rerio*), в англomовній літературі *Zebrafish* або *zebra danio* (рибка-зебра), якнайкраще підходять для експериментів з *GFP*- і *RFP*-трансгенами. Даніо реріо вкрай невибагливі до умов середовища проживання і до кормів. Вони неагресивні і можуть жити в дуже невеликих 4-5 літрових ємностях, швидко і легко розмножуються.

У даніо виявилася ще одна особливість – їх ембріони швидко розвиваються і довгий час залишаються майже прозорими. Та й дорослі риби з ослабленою пігментацією в чималому ступені зберігають цю властивість. Тому, якщо організм трансгенної риби набуває здатність виробляти флуоресцентний білок, то світіння легко буде спостерігати навіть у тому випадку, коли експресія вбудованого в її геном гена відбуватиметься в тканинах, розташованих під шкірою і у внутрішніх органах. Подібні властивості має і японська рисова рыбка – медака (*Orizias latipes*).

Експресія трансгенів контролюється спеціальними послідовностями нуклеотидів у молекулі ДНК, розташованими попереду цих генів – промоторами. Саме від промотора залежить коли і за яких обставин, і в яких тканинах станеться експресія керованого ним гена-репортера. Тому при пересадці генів використовують складну конструкцію найважливішими елементами якої є промотор (він може бути рідним для того організму, в геном якого вводять чужорідний ген, а може бути і чужим, узятим від якого-небудь іншого організму), ген-репортер (чужорідний для даного організму) і послідовність нуклеотидів, що зупиняють синтез мРНК. У наведеному вище прикладі для *GFP*-трансгена був використаний промотор гена цитокератину, який "допускає" експресію цього гена тільки в епідермальних клітинах. У таких випадках кажуть, що промотор тканеспецифічний. Для *RFP*-трансгена також використаний тканеспецифічний промотор гена, відповідального за синтез міозину (одного з білків м'язів, який забезпечує їх скорочення), тому експресія *RFP*-трансгена і відбувається тільки в м'язовій тканині.

У травні 2001 р. *Dr. Zhiyuan Gong* представив на загальний огляд плоди своїх досліджень: відразу три кольорові форми даніо реріо – червону, помаранчеву і зелену (помаранчева створюється при спільному синтезі *GFP* і *RFP* в м'язовій тканині у "двічі трансгенних" риб).

Однак основною метою трансгенних досліджень відносно риб останнім часом стало підвищення коефіцієнта росту в аквакультурі за допомогою введення в геном генетичних структур гормону росту. Дослідження також було спрямовано на інші ознаки, такі як контроль захворювань та репродукції, і трансгенні дослідження повинні зосередитися на таких ознаках, які важко поліпшити, застосовуючи кількісні підходи. Трансгенна риба також може розглядатися як ефективна модель для вивчення регуляції генів та експресії генів і може в потенціалі стати біокомбінатом з

виробництва цінних лікарських препаратів.

Кріопротекторні властивості антифризних протеїнів риб.

Антифризні протеїни – це протеїни, що виробляються в печінці деяких видів бореальних риб (*морські організми, що мешкають в помірній області Північної півкулі*) і в організмі багатьох безхребетних, які містять у своєму складі велику кількість аланіну. Вони ефективно захищають організми риб та інших водних тварин від замерзання плазми крові або гемолімфи при негативних значеннях температури води. Антифризні протеїни специфічно адсорбуються на поверхні де утворюються кристалики льоду, запобігаючи тим самим їх подальшому розростанню, взаємодіють з мембранами клітин, а також здатні пригнічувати процеси рекристалізації. Ці властивості обумовлені унікальною четвертинною структурою антифризних протеїнів – у порівнянні з відомими в даний час кріопротекторами вони в 500 разів більш ефективно знижують температуру замерзання різних розчинів, а також біологічних об'єктів.

У процесі тривалої еволюції костисті риби виробили специфічні механізми зниження точки замерзання крові та інших екстраклітинних біологічних рідин без істотної зміни значень їх осмотичного тиску. Особливо розвинені такі механізми у риб, що мешкають у холодних морських водах. Точка замерзання морської води становить близько $-1,8^{\circ}\text{C}$. Експериментально було встановлено, що риби, в плазмі яких відсутні антифризні протеїни, замерзають і при більш високих температурах, на відміну від риб, що мають в плазмі крові високі рівні антифризних протеїнів і здатних перезимувати в суворох умовах навколишнього середовища.

Однак лососеві риби, а також інші комерційно важливі види риб не здатні синтезувати антифризні протеїни. Тому через різке переохолодження в зимові місяці біля східного узбережжя Канади, де щорічний прибуток від торгівлі продуктами аквакультури сягає 100 млн. дол. США, гине велика кількість лососів, вирощуваних у садках. Останнім часом у вищевказаних країнах були зроблені зусилля з отримання трансгенних лососів з вбудованими генами антифризних протеїнів риб. Результати цих експериментів показали високу ефективність таких підходів в аквакультурі – трансгенні лососі відрізнялися підвищеною стійкістю до низьких температур, що відкриває можливість вирощування лососів і в північних регіонах. Аналогічні результати були отримані і у форелівництві.

Ксенотрансплантація сперматогоній.

Встановлено, що розвиток донорних сперматогоній можливий не тільки в організмі стерильних триплоїдних самців риб одного і того ж виду, але і в близькоспоріднених видах (ксенотрансплантація). Це має важливе значення для збереження видового різноманіття популяцій риб з природних водойм шляхом кріоконсервації зародкових клітин і для отримання сурогатних риб. Гамети риб, що мають великі розміри і тривалий період статевого дозрівання, можна отримувати за порівняно короткий час у сурогатних рибах, що мають невеликі розміри і нетривалий період статевого дозрівання. Досягти цього можна за допомогою ксенотрансплантації

сперматогоній цільових видів риб відповідним реципієнтам (рис. 9).

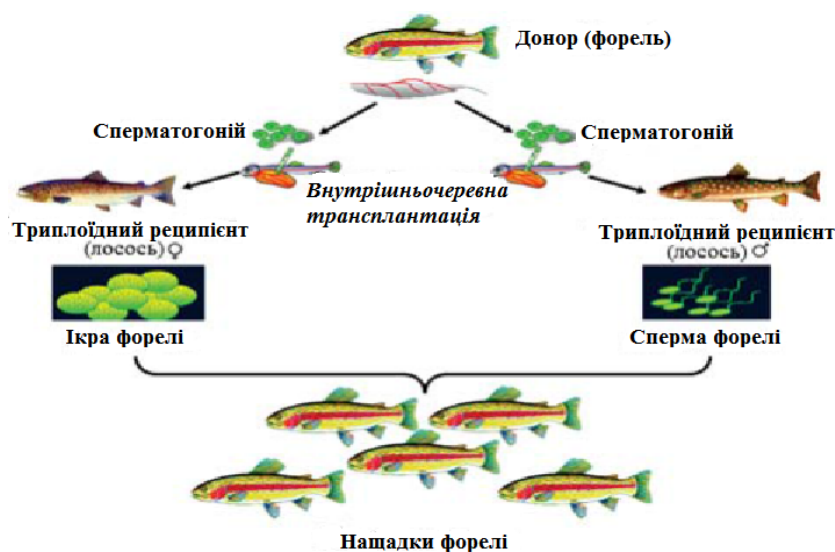


Рис. 9. Ксенотрансплантація сперматогоній

Така технологія економічно доцільна, оскільки скорочує площі для розведення риб в аквакультурі і економить значні ресурси і час. Крім того, вона має велике значення для збереження видового різноманіття популяцій риб з природного середовища шляхом застосування кріоконсервованих зародкових клітин. Схема досвіду збереження зникаючих видів риб представлена на рис. 10.



Рис. 10. Спосіб збереження рідкісних і зникаючих видів риб

Вплив на репродуктивні процеси.

Інтерес до статі деяких видів риб, особливо осетрових і лососевих, обумовлений двома основними причинами. Одна з них – одержання одностатевих самок з метою виробництва великих кількостей ікри, друга – ці

риби є зручною моделлю вивчення диференціації статі нижчих хребетних. Отримання одностатевих самок необхідне також для вирішення проблеми раннього дозрівання самців лососевих риб (близько 60% самців дозрівають пізніше за інших, що знижує їх товарну цінність).

В останні роки кількість господарств, які вирощують одностатевих самок, зростає. Створення таких самок проводять у два етапи – на першому отримують одностатевих самців-реверсантов, потім, при схрещуванні їх зі звичайними самками, – одностатевих самок. Отримання одностатевих самців-реверсантів (XX) досягається шляхом обробки молодих особин риб низькими дозами андрогенів. Саме в ранній період розвитку риб можлива ефективна реверсія статі. Зазвичай з цією метою використовують такі андрогени, як метилтестостерон, метилдегідростерон (МДНТ), або гідроксиандростенідіон (ВПА). Отримані таким чином самці поділяються на два типи особин:

1. Фенотипічні самці з жіночим генотипом (містять 2 X-хромосоми). Ці одностатеві самці (реверсанти) при схрещуванні зі звичайними самками дадуть в потомстві 100% самок з генотипом XX.

2. Нормальні генетичні самці (містять як X-, так і Y-хромосоми).

Ці два вищевказаних типи самців фенотипово не розрізняються між собою. Виявити відмінності між ними можна лише при гістологічних дослідженнях або реципроним схрещуванням, що займає багато часу. Тому в останні роки для прискореного виявлення самців-реверсантів (з XX-генотипом) в багатьох країнах були розроблені молекулярно-біологічні методи, засновані на ДНК-технологіях.

Було встановлено, що до зміни статі райдужної форелі призводило комбіноване згодовування двох форм тестостерону. Про це свідчили як результати методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), так і зміни у гонадах експериментальних особин риб – у деяких з них у процесі реверсії одночасно були присутні як жіночі, так і чоловічі статеві залози, деякі особини форелі були стерильні. Як показали результати проведених досліджень, специфічні олігонуклеотидні праймери до фрагмента Y-хромосоми райдужної форелі ампліфікували очікуваний за розміром фрагмент ДНК. Довжина ПЛР-продукту склала близько 800 пар нуклеотидів. Таким чином, за допомогою методу ПЛР були ідентифіковані генотипи самців райдужної форелі. Слід зазначити, що застосування ПЛР для виявлення реверсантів стало можливим після виявлення канадськими дослідниками у чавичі та озерної форелі повторюваних (близько 200 разів) послідовностей ДНК розмірами 8, 16, 24 і 32 т.п.н. на Y-хромосомі. Була розроблена ПЛР-діагностика самців, широко використовувана в сучасному рибництві. З метою діагностики ДНК виділяють з плавників або з крові, і риба залишається живою.

В даний час розроблено велику кількість молекулярних маркерів для різних видів лососевих риб.

Питання для самоперевірки

1. Які показники трангенезу риб повинні обов'язково визначатися?
2. Які гени стали широко використовуватися для вдосконалення трансгенних технологій для риб?
3. В чому полягає роль промотора при здійсненні експресії гена-репортера у трансгенних технологіях?
4. Які напрями створення трансгенних риб досліджуються в наш час?
5. В чому полягає особливість антифризних протеїнів риб? Чому корисно отримання трансгенних лососів з вбудованими генами антифризних протеїнів риб?
6. З якою метою здійснюють ксенотрансплантацію сперматогоній цільових видів риб відповідним реципієнтам?
7. Яким чином і з якою метою здійснюють вплив на репродуктивні процеси риб?

5. Трансгенні птахи

Створення ліній трансгенних сільськогосподарських тварин трудомістке через досить тривалий період їх статевого дозрівання, відносно низьку плодючість і високу вартість окремої тварини. З цієї точки зору трансгенна птиця володіє великими перевагами і багато лабораторій світу працюють над проблемою її отримання. Однак особливості розмноження такої птиці створюють серйозні проблеми для дослідників. Курка утворює на добу одну запліднену яйцеклітину, яка дуже велика і ніжна для будь-яких маніпуляцій з нею, як це робиться з яйцеклітинами ссавців при їх ін'єкції чужорідної ДНК.

Для нормального ембріонального розвитку пташиної яйцеклітини необхідні третинні оболонки – білкова, підшкаралупна і шкаралупа. Дроблення курячої яйцеклітини починається вже в білковому відділі яйцепроводу, а у свіжознесеному яйці є вже 50-60 тисяч клітин. Тому перша трансгенна птиця була отримана за допомогою *ретровірусних векторів*. Ретровіруси були головними претендентами на роль векторів для перенесення генів тому, що в нормальних умовах вони самі включаються в геномну ДНК господаря і реплікуються. Тому багато дослідників намагалися внести чужорідні гени у зародкову лінію, інфікуючи ембріони як здатними до реплікації, так і такими, що втратили здатність до реплікації ретровірусними векторами. Успішне вбудовування трансгена в цих дослідах склало від 0,8 до 5%. Введення рекомбінантного вектора лейкозу птахів у бластодерму, курячих ембріонів, дало позитивний результат щодо перенесення генетичного матеріалу в зародкову лінію. З рекомбінантним вірусом були отримані повні трансгени. Дослідження щодо подальшої розробки технології використання ретровірусів з метою отримання трансгенеза у птахів видаються важливими і продовжуються до теперішнього часу.

Існують два методичних підходи отримання безвірусного трансгенезу у птахів.

Один з них – одержання химер підсадкою ДНК в ембріони чужих клітин. Клітини ранньої бластодерми або примордіальні клітини виділяють і ін'єктують в їх ядра чужорідну ДНК. Потім ці ін'єктовані клітини імплантують в ембріони, де вони приживаються і діляться. Таким шляхом були отримані соматичні химери і химери зародкової лінії (рис. 11).

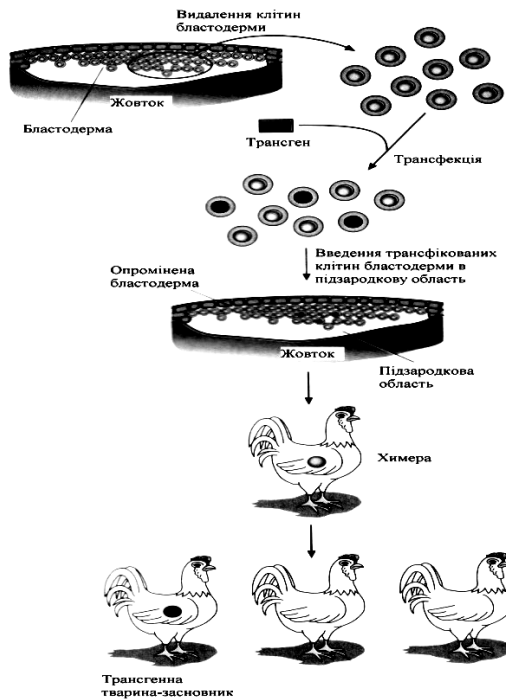


Рис. 11. Створення трансгенної птиці

Створених химерних особин вирощують і отримують від них потомство. Деяка частина нащадків, що походять з трансгенних зародкових клітин, виявляються трансгенними. Головним недоліком цього підходу є мала ефективність клітинних пересадок. Згодом було показано, що клітини зародкової лінії можуть бути ефективно перенесені та інтегровані в ембріон.

Методичні прийоми застосування ембріональних клітин в якості переносників чужорідної ДНК з метою отримання трансгенної птиці продовжують розроблятися (рис. 12). Технологія отримання трансгенних ембріональних химер активно розвивається в таких країнах, як США і Японія, і на сьогоднішній день є основним претендентом на створення комерційно значущих трансгенних ліній птиці. Технологія ця вельми складна і дорога, включає такі стадії, як виділення і культивування первинних статевих клітин (а), їх подальшу трансфекцію чужорідною ДНК (b) і підсадку в ранні ембріони (с).

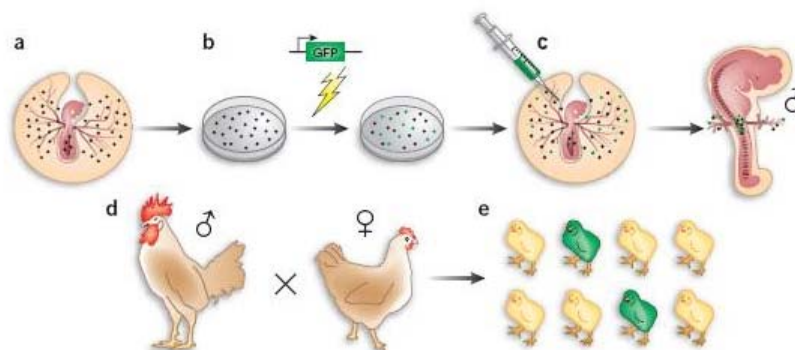


Рис. 12. Технологія отримання трансгенних ембріональних химер

Отримання трансгенної птиці методом *штучного осіменіння*, традиційно і широко використовуваного в птахівництві прийому, виглядає дуже перспективно. Все більша кількість птахівників-селекціонерів говорить про майбутнє генно-інженерного конструювання нових промислових ліній і кросів з використанням, у тому числі, генофонду рідкісних і зникаючих порід птиці. Були проведені дослідження зі застосування спермій в якості вектора переносу чужорідної ДНК в яйцеклітині курей. З використанням міченої ДНК було показано, що близько 80% радіоактивної ДНК знаходилося в сперматозоїдах.

Для збільшення ефективності переносу гена за допомогою сперматозоїдів (*sperm-mediated gene transfer, SMGT*) запропоновано доповнити метод використанням рестрикційних ферментів (*restriction enzyme mediated integration, REMI*). Лінійна ДНК разом з рестриктазою вводиться в клітину-мішень шляхом електропорації. Передбачається, що рестриктаза потім розрізає геномну ДНК для полегшення інтеграції екзогенної ДНК з відповідними «липкими» кінцями. За використання сперматозоїдів півня, як вектору трансформації, отримані трансгенні курячі ембріони з генами β -галактозидази. Ефективність трансформації яйцеклітин склала 23% від кількості запліднених яєць.

Застосування *технології мікроін'єкції ДНК* для птахів надзвичайно складне через феноменально великий розмір ооцита. Проте деякі дослідницькі колективи вивчали можливість такого підходу. Була зроблена спроба інкубувати *in vitro* запліднені курячі яйцеклітини, вилучені з верхньої частини білкового відділу яйцепроводу. На цій стадії курячий ембріон знаходиться на одноклітинній стадії розвитку, тому існує теоретична можливість проведення мікроін'єкції чужорідної ДНК.

Було показано, що існує можливість *культивувати запліднену курячу яйцеклітину в шкаралуні* з білком від іншої курки. Виявилось можливим подовжити *in vitro* ембріональний розвиток вилученої заплідненої яйцеклітини курки до стадії курчат, що вилупилися. В результаті – кількість життєздатних курчат, що вилупилися, отриманих з культивованих яйцеклітин, досягла 20%. Таке культивування може використовуватися для різних експериментальних цілей, оскільки забезпечує доступ до ембріону, що

розвивається, від одноклітинної стадії до стадії вилуплення. Різні стадії системи культивування можуть використовуватися окремо, залежно від експериментальних вимог.

Була досліджена можливість *ін'єкції чужорідної ДНК з наступним культивуванням ембріона*, як метод для отримання трансгенної птиці. Для ін'єкцій використовували генну конструкцію з репортерним геном β -галактозидази.

Результати ін'єкції чужорідної ДНК на стадії єдиної клітини, з подальшим укороченим культивуванням ембріона, показали, що включення введеної ДНК в хромосоми курчати порівняно рідкісна подія. Така інтеграція може бути замаскована присутністю позахромосомних копій введених плазмід.

Розроблений метод *прямої ін'єкції генної конструкції в цитоплазму свіжезаплідненої яйцеклітини курки*, з подальшою її інкубацією до вилуплення. Яйцеклітини для ін'єкції вилучали з білкової області яйцепроводу курки, де вони вже покриті тонким шаром білка, але без шкаралупи.

Виробництво трансгенних курчат цим методом – досить складне завдання. Тільки 50% ін'єктованих яйцеклітин доживає до стадії вилуплення, рівень її низький – в межах 15%. Однак аналіз на трансгенність ембріонів і курчат, отриманих в цих експериментах, вселяє надію. При використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – було показано, що зразки ДНК від майже половини ембріонів і курчат, які прожили останні 12 днів культивування, містять трансген. Цим методом були отримані трансгенні кури і показано успадкування трансгена. Усі первинні трансгенні особини були мозаїчними. Надалі спадкування трансгена відбувалося відповідно до закону Менделя і при культивуванні до стадії вилуплення досягало близько 60% ембріонів. Однак, при відтворенні цієї методики в інших лабораторіях, цей показник не перевищував 3-10%.

Інший варіант *мікроін'єкції ДНК в яйцеклітини птахів* передбачає утворення третинних оболонок яйцеклітини природним чином – в статевих шляхах птиці. В основі методу лежить хірургічна операція, яка забезпечує доступ до яйцеклітини, проведення в неї ін'єкції ДНК, і імплантацію назад в яйцепровід для формування повноцінного інкубаційного яйця. Подальше вдосконалення цього методичного підходу дозволило проводити ін'єкції ДНК в яйцеклітини без їх вилучення зі статевих шляхів птиці, внаслідок чого істотно зросла ефективність методу. Цим методом були отримані трансгенні кури з геном гормону росту людини, геном β -галактозидази, геном людського β -інтерферону та перепела з геном гормону росту бика. Основна перевага цього методу полягає у відсутності необхідності використання складної апаратури і середовищ для культивування ембріонів *in vitro*, виділення та пересадки бластодермальних або примордіальних (*утворюються в процесі мітотичної проліферації первинних зародкових клітин (оогоній)*) клітин.

Таким чином, трансгенних птахів можна отримувати без використання

ретровірусів, і створення трансгенних популяцій є здійсненим завданням. Для досягнення успіху і практичного використання трансгенні птахи повинні мати фенотип, який перевершував би рівень, вже досягнутий в птахівництві. Наприклад, збільшенням швидкості росту, поліпшенням конверсії корму, яйценосністю, зменшенням ожиріння тушки, збільшенням стійкості до захворювань і т.ін. Створення трансгенних птахів з генами, що забезпечують виробництво корисних фармацевтичних білків, що накопичуються в яйці, також може мати широке практичне використання.

Що стосується птахівництва, то використання трансгенезу для перенесення корисного гена навіть від однієї лінії птиці до іншої (що досягне звичайними селекційними методами) дає мінімум 7-8 річний вигравш і економію коштів за рахунок виключення зворотних схрещувань, необхідних для видалення непотрібних генів, що передаються при природній статевій гібридизації. Однак, справжні вигоди від переносу генів будуть зрозумілі з часом після створення і повного вивчення отриманої трансгенної птиці.

Питання для самоперевірки

1. Які проблеми виникають при створенні трансгенних птахів?
2. Чому недоцільно створювати трансгенну птицю за допомогою ретровірусних векторів?
3. Які існують методи здійснення безвірусного трансгенезу у птахів?
4. Які технології мікроін'єкцій ДНК для птахів застосовують?
5. Яким чином можливе використання сперміїв в якості вектора переносу чужорідної ДНК в яйцеклітині курей?
6. Які напрями створення трансгенних птахів можуть мати широке практичне використання?

6. Біотехнологічна інтенсифікація процесів рубцевого травлення жуйних

Загальновідомо яку величезну роль у процесах засвоєння тваринами поживних речовин раціону грають мікроорганізми шлунково-кишкового тракту. Досить, наприклад, нагадати, що тварини позбавлені ферментів, що впливають на клітковину (целюлозу рослин) і не можуть самостійно засвоювати цей найважливіший компонент корму, який за поживністю займає 25-30% від усього спожитого корму. Засвоєння клітковини відбувається лише за допомогою мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Мікрофлора синтезує також ряд важливих вітамінів та інших необхідних компонентів годівлі тварин. Цей сформований в процесі еволюції симбіоз тварин з мікроорганізмами повинен розглядатися як єдина система. Істотним недоліком існуючої теорії годівлі тварин є недооцінка цієї інтегрованої системи. Тому на перспективу, думаючи про селекцію тварин, слід враховувати і необхідність спрямованого впливу на якості симбіотичної

мікрофлори їх травного тракту. Потрібна селекція цих мікроорганізмів, що йде паралельно селекції самих тварин. Зрозуміло, в процесі селекції тварин змінювалася і мікрофлора, але ці процеси не завжди відбувалися синхронно.

Для вирішення цих питань найважливішими завданнями є:

- створення штамів мікроорганізмів, здатних функціонувати в шлунково-кишковому тракті тварин і більш ефективно утилізувати клітковину. Це різко підвищить ефективність всієї галузі тваринництва;
- створення штамів мікроорганізмів, які сприяють засвоєнню силосу з сільськогосподарських культур, що містять багато крохмалю;
- створення штамів продуцентів незамінних амінокислот, особливо лізину, які могли б нормально функціонувати в шлунково-кишковому тракті тварин. Це дозволить більш ефективно трансформувати поживні речовини раціону в продукти тваринництва;
- створення штамів симбіонтів-продуцентів ряду вітамінів, які знаходяться в дефіциті в традиційних раціонах.

Симбіоз сільськогосподарських тварин і мікроорганізмів відіграє важливу роль у нормальному функціонуванні тварин та реалізації їх генетичного потенціалу продуктивності.

В наш час, в результаті спільних досліджень фахівців-зоотехніків, фізіологів, генетиків і мікробіологів накопичено досить значний і цікавий матеріал з проблеми інтродукції мікроорганізмів у травний тракт сільськогосподарських тварин і птахів, вивчено процеси адаптації цієї мікрофлори, вплив її на біологічні та господарсько-цінні ознаки макроорганізмів.

Роль мікрофлори особливо помітна у жуйних тварин – саме мікроорганізми передшлунків забезпечують засвоєння целюлози і синтез білка з небілкових азотистих сполук.

Однак і в інших видів сільськогосподарських тварин симбіотичні відносини, що виникли в ході еволюції, відіграють значну роль.

Одним з найважливіших мешканців кишечника є кишкова паличка – *Escherichia coli*, – детально вивчений в генетичному відношенні об'єкт, найбільш часто використовуваний в експериментах з генетичної інженерії (рис. 13). Численні дослідження, виконані на людях-добровольцях і лабораторних тваринах, не підтвердили песимістичних прогнозів щодо біологічної небезпеки генно-інженерних експериментів, і не виключена можливість свідомого приживлення сконструйованих штамів *E. coli K12* – продуцентів біологічно активних сполук в шлунково-кишковому тракті тварин на певний проміжок часу. У зв'язку з цим, досліджено адаптацію штамів, що продукують біологічно активні речовини в умовах кишечника тварин.

З іншого боку мікрофлора шлунково-кишкового тракту сільськогосподарських тварин (особливо рубця жуйних) являє собою унікально відшліфовану екосистему, чисельні компоненти якої можуть бути високоперспективні й щодо використання їх для моногастричних тварин.

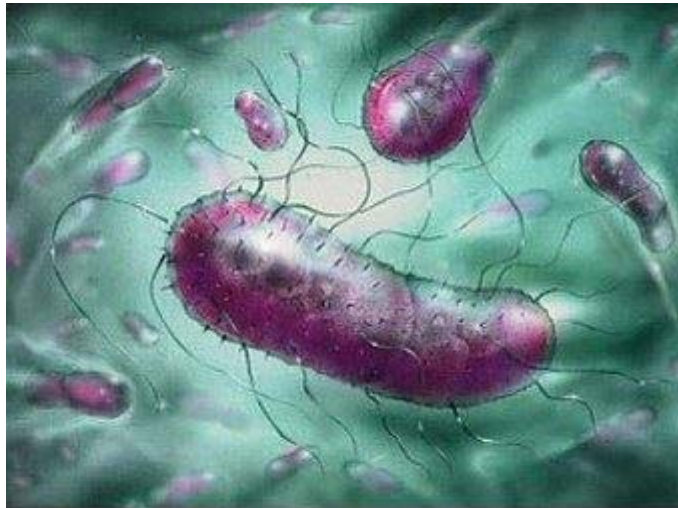


Рис. 13. Кишкова паличка – Escherichia coli

Дослідження останніх років свідчать про зростаючий інтерес вчених і практиків до використання живих мікроорганізмів як біологічних регуляторів метаболічних процесів в організмі тварин і птиці. Насамперед, це пробіотики, пребіотики, синбіотики.

Одним з найбільш плідних шляхів використання корисних форм мікроорганізмів у тваринництві є препарати-пробіотики, що отримані на основі мікроорганізмів-симбіонтів шлунково-ишкового тракту. Застосування таких препаратів дозволяє прискорити ріст молодняку і зменшити його відхід. За ефективністю застосування пробіотики не поступаються антибіотикам (кормового та ветеринарного призначення), але не мають побічної дії на організм тварини і мікрофлору кишечника, тобто є екологічно чистими. Їх використання дозволяє отримувати продукцію тваринництва, що не містить залишків хіміотерапевтичних і антибіотичних препаратів.

До пробіотиків відносять живі мікробні культури, які мають корисну дію на тварину-господаря шляхом поліпшення її кишкового балансу.

Поняття "пребіотик", вперше сформульоване *R. Gibson* (1995), використовується для позначення речовин, які не абсорбуються в кишечнику, але сприятливо впливають на організм господаря шляхом селективної стимуляції росту або активації метаболізму корисних представників його кишкової мікрофлори. Іншими словами пребіотики можна назвати стимуляторами, або промоторами, пробіотиків.

Синбіотики – це комплекси пробіотиків з різними пребіотичними речовинами, а їх дія заснована на синергізмі пробіотиків і пребіотиків, за рахунок якого мікроорганізми-пробіотики, що вводяться, не тільки більш ефективно імплантуються в шлунково-кишковому тракті господаря, але і стимулюють його власну мікрофлору.

Багато мікроорганізмів, що використовуються для розробки і створення пробіотиків – це чисті культури бактерій, виділених з мікрофлори рубця тварин. Це целюлолітичні бактерії роду *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, що гідролізують целюлозу, целобіозу, ксилан і

зброджують глюкозу, фруктозу, манозу, лактозу; молочнокислі бактерії роду *Lactobacillus*, *Str. Bovis*, що розщеплюють моно- і дисахариди; протеолітично активні бактерії *Butyrivibrio sp.*, *Succinovibrio sp.* здійснюють гідроліз білків та ін.

Відома технологія отримання та застосування в тваринництві пробіотиків на основі молочнокислих біфідогенних заквасок з використанням вторинних молочних ресурсів.

Перспективні дослідження з розробки рекомбінантних пробіотиків з використанням методів біотехнології. Біотехнологічні прийоми синтезу ДНК і клонування генів дозволяють змінювати екосистему рубця і процеси ферментації в потрібному напрямку за рахунок генетичних модифікацій.

Отримано рекомбінантні пробіотики на основі бактерії роду *Bacillus*.

З рубця великої рогатої худоби була виділена асоціація целюлозолітичних бактерій. На основі цієї асоціації був створений препарат-пробіотик целлобактерін для підвищення перетравності клітковини і підвищення збереженості молодняка.

Розроблено новий підхід, за допомогою якого можна буде забезпечити велику рогату худобу білком, збагаченим незамінними амінокислотами. Звичайне додавання білків в корми – кошковий і не досить ефективний спосіб, оскільки білки і амінокислоти руйнуються бактеріями рубця ще до того, як тварина встигає їх використати. Крім того, основну кількість білку вони отримують не з кормами; його забезпечують мікроорганізми рубця. Раціон тварин можна збагатити, якщо спрямовано модифікувати ці бактерії. Для цього спочатку був синтезований білок з високим вмістом залишків метіоніну, лізину і лейцину. Він складався з 100 амінокислот, 57 з яких були незамінними, і мав стабільну α -спіральною конфігурацію. Потім, за допомогою 14 нуклеотидів, що частково перекриваються, синтезували його ген і зшили його з геном білку, який зв'язує мальтозу. Отриманий гібридний ген експресували у *E.coli* під контролем промотора транскрипції. На частку гібридного білку приходилося приблизно 12% сумарного внутрішньоклітинного білку. В наш час досліджується наскільки бактерії, що існують у рубці, здатні синтезувати цей білок.

Забезпечити жуйних достатньою кількістю білку і амінокислот можна двома способами. По-перше, запобігти розпаду білків і амінокислот у рубці шляхом модифікації властивостей мікроорганізмів, які відповідають за розпад. По-друге, захистити кормові білки і амінокислоти від атак мікроорганізмів. У першому випадку необхідно блокувати або інгібувати системи мікробних ферментів, що руйнують амінокислоти. Труднощі цього підходу полягають у тому, що в рубці існують сотні різних мікроорганізмів і найпростіших, кожен з яких має значну кількість ферментів.

Що стосується захисту білків і амінокислот від руйнування у рубці, то це можливо зробити механічним і хімічним шляхами. Механічний спосіб захисту амінокислот полягає в тому, що часточки амінокислот певного розміру можуть бути вкриті конкретними матеріалами, або залиті в них. Такі

часточки здатні проходити через рубець у незмінному вигляді. В сичузі або в тонкому кишечнику, навпаки, амінокислота повинна звільнитися. Це перша вимога до матеріалу покриття. Часто використовується залежність розчинності або набрякання матеріалів від рН середовища. Другою вимогою до матеріалів покриття є їх нетоксичність і здатність забезпечувати тонкий покривний шар. До таких матеріалів в основному належать жирні кислоти з довгим ланцюгом, такі як стеаринова і пальмітинова, а також гідратовані жири.

Хімічний захист амінокислот, на відміну від фізичних методів полягає в модифікації молекул. Вимоги залишаються аналогічними: речовина, що захищає, повинна бути стійкою у рубці, але потім звільнювати амінокислоту в сичузі або тонкому кишечнику. Одним з таких продуктів є N-гідроксиметилметіонінкальцій. У цієї сполуки аміногрупа метіоніну захищена гідроксиметильною групою, на яку впливає рН середовища. Карбоксильна група стабілізована створенням солі кальцію. Захисна група забезпечує достатню стабільність по відношенню до дії мікроорганізмів рубця, але миттєво відщеплюється з утворенням вільної амінокислоти у кислому середовищі сичуга. При використанні вказаного препарату покращується молочна продуктивність корів в основному за рахунок збільшення величини надою в середньому на 7,5% за добу.

Питання для самоперевірки

1. Які питання необхідно вирішити для покращення якості симбіотичної мікрофлори передшлунків жуйних тварин?
2. Які існують біологічні регулятори метаболічних процесів в організмі тварин і птиці?
3. В чому полягає різниця між пробіотиками, пребіотиками і синбіотиками?
4. Які існують шляхи покращення процесів ферментації у рубці жуйних?
5. Вкажіть способи підвищення якості білків, що створюються мікроорганізмами рубця.
6. Які способи захисту білків і амінокислот від руйнування у рубці існують?

7. Генно-модифіковані організми (ГМО) і біобезпека

7.1. ГМО, агрономічно важливі характеристики рослин; змінені поживні властивості та склад ГМ-продуктів

Основним із постулатів необхідності широкого розповсюдження ГМО є потреба інтенсифікації розвитку сільського господарства. Згідно прогнозам населення Землі до 2050 року може сягнути 8-10 млрд. Тому вкрай потрібні

абсолютно нові технології, що дозволяють більш повно використовувати біологічний потенціал рослин. Саме ГМ-рослини, що мають змінені певні агрономічні та фізіологічні характеристики (стійкі до певних гербіцидів, шкідників і хвороб, до засолення, дії високих і низьких температур; склад, тривалість збереження, термін визрівання) і вирішують цю гостру проблему.

Нині ГМО поступово завойовують світ. На даний час трансформовано близько 140 видів різних рослин. Комерціалізовано (отримано дозвіл на вирощування у відкритих системах з промисловою метою, на використання як харчових продуктів чи як корму для тварин) відносно невелику їх кількість.

На світовому ринку трансгенних культур широко представлені: картопля, рапс, бавовна, соя, цукровий буряк, кукурудза, папайя, люцерна та деякі інші рослини. Причому трансгенна соя поширена вже більше, ніж звичайна: її частка у світових посівах становить майже 80%, а в США – майже 90%.

Останнім часом у галузі генної інженерії перелік завдань, які вирішують дослідники, значно розширився. Якщо перші роботи були зосереджені насамперед на трансформації рослин за ознаками, що можуть мати певне значення для сільського господарства (стійкість до вірусів, певних гербіцидів і шкідників), то зараз спектр питань у цьому напрямку значно більший. На сьогодні існують три покоління ГМ-культур:

Перше покоління – рослини, модифіковані з метою надання їм стійкості до біотичних і абіотичних факторів:

- стійкість до комах-шкідників (СК – стійкий до комах; англ. *IR – insect resistance* або *Bt – Bacillus thuringiensis* – бактерії, гени якої використовуються) – модифікації кукурудзи, бавовнику;

- стійкість до використання гербіцидів (ГС – гербіцидо-стійкий; англ. – *herbicide-tolerance crops*), тобто продовження життєдіяльності після загибелі оточуючих бур'янів – модифікації сої, кукурудзи, бавовнику, ріпаку.

- модифікації, стійкі до вірусних (наприклад, папайя), грибкових і бактеріальних інфекцій.

- культури, стійкі до абіотичних факторів (морозу, посухи тощо). У 2013 р. в США вперше почали вирощувати посухостійку кукурудзу.

Виведено модифікації культур, одночасно стійких до двох і більше факторів, тобто *стекерні* генні модифікації (кукурудза, стійка до гербіцидів і комах-шкідників).

Друге покоління – рослини, модифіковані з метою поліпшення їхніх властивостей. Наприклад, насіння олійних культур зі зміненим профілем жирних кислот, високо-амілазна кукурудза, лінії рослин із підвищеним вмістом незамінних амінокислот, мінералів і вітамінів. Також відомий "золотий" рис, який містить значну кількість провітаміну А. Подібні процеси, спрямовані на збільшення кількості поживних речовин, називаються *біофортифікацією*.

Третє покоління – організми, які модифіковано з метою використання при виробництві ферментів, хімічних сполук для фармакологічних препаратів, пластмас, здатних розкладатися тощо. Дослідження знаходяться на початковому етапі.

У 2013 р. майже 18 млн фермерів у 28-ми країнах світу засіяли біотехнологічними культурами 175,2 млн га. Це понад чотири ріллі України. Ще в 31-й країні надано дозвіл на імпорт і використання ГМ-рослин як продуктів харчування та кормів. Посівні площі під культурами з привнесеними ознаками збільшилися у період з 1996 р. по 2013 р. (з початку комерційного впровадження трансгенних культур) у 100 разів, що є безпрецедентним у новітній історії сільського господарства. У 2013 р. на ринок трансгенних культур допущено та культивуються понад 30 ліній ГМ-культур, переважна кількість яких належить до першого покоління, зареєстровано ГМ-культур: 27 ліній сої, 130 – кукурудзи, 3 – ріпаку, 7 – рису, 1 – пшениці, 31 – картоплі, 11 – томатів, хоча комерційно вирощується значно менша кількість ліній кожної культури. За прогнозом на 2015 р., враховуючи число ліній, які перебувають на стадії розробки та на стадії прийняття, вирощуватиметься 124 лінії ГМ-культур. Зараз акцент уваги перенесено на зміни біохімічних властивостей культур, які стосуються поліпшення смакових властивостей і збагачення їх корисними для людини речовинами. Зокрема, існують культури зі зміненим складом: вуглеводним – лінія картоплі, жирнокислотним – 7 ліній сої, амінокислотним – 2 лінії кукурудзи, а також 41 лінія кукурудзи зі зміненим метаболізмом вуглеводів та 8 ліній цієї рослини зі зміненою альфа-амілазною активністю.

За даними на 2013 р., ГМ культури вирощують 8 індустріально-розвинутих країн та 19 країн, що розвиваються. Лідером вирощування ГМ-культур залишаються США – біотехнологічні рослини в 2013 р. займали площу 70,1 млн га, що становить 40% усіх сільськогосподарських угідь, зайнятих під ГМ-культури в світі.

У 2013 р. запроваджено до комерційного вирощування 2 лінії посухостійких рослин, що має велике значення з огляду на кліматичні зміни. У США майже дві тисячі фермерів засіяли 50 тис. га новою лінією кукурудзи *Corn Belt*. Вирощування посухостійкої кукурудзи має набути масового поширення в 2017 р. у країнах Африки. А в Індонезії розроблено першу посухостійку цукрову тростину, яка набула комерційного застосування у 2014 р.

Для оцінювання впливу гербіцидів на навколишнє середовище в Корнуельському університеті в 1990-ті роки запропоновано показник – коефіцієнт екологічного впливу (КЕВ) – відносна величина, яка виражає вплив пестицидів на довкілля, з урахуванням токсичності для тварин і людини, дикої природи, а також місця використання, хімічного складу ґрунту, водних і наземних ефектів. Цей коефіцієнт ширший, ніж просто дані про використану кількість активного компонента гербіцидів. Зменшення цього коефіцієнта відбулося в результаті зниження використання гербіцидів.

До переваг вирощування культур стійких до гербіцидів відносять:

- зменшення витрат на обробку ґрунту, машинне обладнання та паливе;
- впровадження технологій захисту ґрунту або вирощування без його обробки, що додатково економить кошти (людські та паливні ресурси, зайняті на обробці ґрунту), а також зменшення ерозії ґрунту, додаткове утримання вологи;
- підвищення ефективності боротьби з бур'янами зменшує час збору культури, зростає рівень якості врожаю;
- зниження потенційного ризику через надлишок гербіцидів у ґрунті, які можуть зашкодити культурі в наступному сезоні, та зменшення витрат на гербіциди в подальших сезонах у результаті підвищення ефективності боротьби з ними.

ГМ-культури, стійкі до комах-шкідників (СК-культури), – відрізняються від ГМ-культур, стійких до гербіцидів. СК-культури завдяки модифікації можуть продукувати певні білки, токсичні для різних видів комах-шкідників.

Основні переваги вирощування стійких до комах культур:

- скорочення витрат палива (обробка інсектицидами відбувається з повітря);
- скорочення витрат на механізацію, збільшення вільного часу фермерів у результаті скасування процедури обприскування інсектицидами;
- поліпшення якості зерна за рахунок зменшення рівня мікотоксинів (у деяких країнах, наприклад, Іспанії та Філіппінах фермери отримують премію за продаж якісного зерна кукурудзи);
- зменшення шкоди здоров'ю фермерів через використання інсектицидів, що особливо актуально серед бідних фермерів у країнах, що розвиваються, через слабкі засоби індивідуального захисту.

В Україні ГМО у промислових масштабах з'явилися у 1997 р., коли «Монсанто» розпочала висаджувати ГМ-картоплю сорту «Новий лист» на експериментальних полях у Волинській, Ровенській, Черкаській та Київській областях. У 1999 р. біоТНК отримала висновок МОЗ на «Новий лист», як на безпечний продукт. «Монсанто» навіть хотіла зробити Україну своїм плацдармом у Європі і глобальним експортером насіння картоплі. Але у червні 1999 р. Мінагропром виніс негативний висновок, і 1300 т ГМ-картоплі було поховано на землях колгоспу ім. Шевченка Черкаської обл.

За економічними прогнозами *Ukrainian Economic Trends Forecast* на III квартал 2013 р., підготовленими аналітичною групою *Da Vinci AG*, Україна в перспективі через 5-7 років може стати ключовим виробником ГМ-продукції на європейському континенті, оскільки для цього існують значні перспективи. Британська *PG Economics* спільно з українським Інститутом харчової біотехнології та геноміки оцінила можливий економічний ефект від упровадження ГМ-технологій в українському аграрному секторі. Зокрема, впровадження ГМ-насіння на розсаду може збільшити щорічні прибутки

країни на 525 млн дол. США. Сільськогосподарські біотехнології, якщо їх авторизують для використання в українських господарствах, забезпечать помітний економічний і продовольчий вигравш, піднімуть прибутковість господарств і зменшать ризики. Покращуватиметься й стан навколишнього середовища, оскільки фермери почнуть використовувати більш м'які гербіциди, а інсектициди замінять на стійкі до комах лінії культур.

Вчені пропонують застосувати ГМ-технології для вирощування чотирьох традиційних сільськогосподарських культур – сої, кукурудзи, ріпаку та цукрового буряка. Причому, пропонується брати такі ГМ-сорта рослин, які стійкі до гербіцидів, а кукурудзи – ще й до певних видів комах-шкідників. Незважаючи на повну заборону використання в Україні генномодифікованих сортів рослин, більша частина сої в Україні вирощена із застосуванням гербіцидо-толерантної технології. Крім того, в Україні застосовують сорти кукурудзи, які стійкі до різних шкідників. Існує ще кілька економічно обґрунтованих аргументів щодо легалізації ГМ-технологій в Україні. За оцінками фахівців, їх використання має підвищити врожайність і, відповідно, збільшити валовий збір. За чотирма базовими сільськогосподарськими культурами прибуток становитиме від 1,5 до 9,5%. Використання гербіцидів при догляді за ними скоротиться на 4,4-7,8%. У результаті використання толерантних до гербіцидів ГМ-культур вплив гербіцидів на довкілля скоротиться на 15-24%. Скорочення кількості обробок пестицидами дасть змогу заощадити від 0,78 до 1,56 млн л пального; в атмосферу буде викинуто менше вуглекислого газу – від 2,73 до 5,35 млн кг.

В Україні щорічний прибуток на рівні фермерських господарств за визначеними перевагами застосування ГМ-культур може становити для ГМ-сої від 28 до 66 млн дол. США при 50%-ному рівні запровадження і від 50 до 119 млн дол. США при 90%-ному рівні, який є типовим для більшості країн. Залежно від рівня запровадження ГМ-кукурудзи (50 або 70%) щорічний додатковий прибуток фермерських господарств становитиме від 46 до 111 млн дол. США.

7.2. Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО

Питання заборони чи, як мінімум, обмеження використання ГМО зумовлено, насамперед, тим, що проблема можливого впливу ГМО на людину та і біосферу є недостатньо вивченою. Навіть захисники ГМО не дають твердої гарантії їх безпеки. Однак, з їх точки зору, ризик є виправданим.

Можна виділити декілька основних аспектів потенційної небезпеки ГМО.

З огляду впливу на агроєкосистеми та природні біоценози:

1. Можливість переносу генів ГМ-культур на диких родичів модифікованих культур. Один із наслідків – зниження біологічного різноманіття.

2. Горизонтальний перенос генів на немодифіковані сорти рослин тих самих, що і модифіковані, видів.

3. Формування нових рас комах, стійких до Bt-токсинів, котрі утримуються у відповідним чином модифікованих культурах.

4. Стійкі до шкідників культури можуть виявитися небезпечними як для шкідників, так і для інших безхребетних (як не пов'язаних, так і пов'язаних між собою трофічними ланцюгами).

5. Провокування підвищеного використання хімічних засобів захисту при культивування гербіцидостійких ГМ-рослин.

6. Можливість появи «супербур'янів» (ген стійкості до гербіцидів може передаватись на споріднені рослини різними шляхами: анемохорія (*пасивне поширення плодів, насіння, спор та ін. повітряними течіями, іноді на досить великі відстані*), анемофілія (*вітрозапилення*), через пилок).

Біолого-соціально-економічні наслідки використання ГМО:

1. ГМ-культури, що використовуються у харчових продуктах, можуть привносити в них нові алергени, внаслідок чого постраждають люди з підвищеною чутливістю до алергенів.

2. Привнесення до рослин генів резистентності до антибіотиків, що використовуються біотехнологічними компаніями як маркери, може зумовити підвищену стійкість патогенної мікрофлори людини до відповідних бактерій.

3. Підвищення рівня токсичних речовин у рослинах.

4. Монополізація сільськогосподарських ринків корпораціями, що випускають ГМ-рослини за рахунок закупівлі насінневих компаній.

Генетичний ризик та біобезпека у біоінженерії. Вбудова в ДНК реципієнтної клітини чужорідного донорського гена співпорядковано з певними труднощами, головними з яких є:

- забезпечення точної адресної вставки гена чи групи генів, а також їх нормального функціонування – експресії. Ця проблема існує постійно і її вирішення у багатьох випадках поки що носить у значній мірі випадковий характер;

- можливого отримання мутантів, що створюють токсичні чи алергенні для людини білки або інші небезпечні сполуки. Реальний ризик, пов'язаний з появою чужорідного гена у реципієнтній клітині, гіпотетично завжди присутній. Це, перш за все, може бути зумовлено *плейотропним* ефектом (*плейотропія - явище множинної дії гена. Виражається в здатності одного гена впливати на кілька фенотипічних ознак. Таким чином, нова мутація в гені може вплинути на деякі або всі пов'язані з цим геном ознаки*);

- можливого індукування ендогенних систем рекомбінації і активації генів, що «мовчать»;

- спонтанний перенос із пилком в інші рослини генів-модифікаторів, при взаємодії яких можлива поява нових генотипів з небезпечними для людини і довкілля властивостями.

Все це дає підстави вважати, теоретично можливим виникнення при трансгенозі генотипів, небезпечних для здоров'я і життя людини. Ризик отримання таких мутантів значно збільшується при використанні штучних, синтетичних генів для отримання трансгенних рослин, тварин і мікроорганізмів з поліпшеними і принципово новими властивостями.

Явища і закономірності, що зумовлюють багаторічну стабільність біобезпеки у біоінженерії. Багаторічна стабільна біобезпека у біоінженерії зумовлена наступними основними явищами і закономірностями:

1. Використання природних генів, котрі протягом усієї еволюції приймали і приймають участь у рекомбіногенезі, у процесі якого напрацьовано механізми на усіх рівнях організації біологічних об'єктів, що забезпечують стійкий характер репарації порушених процесів біосинтезу білків;

2. Розробкою і постійним застосуванням ефективних методів моніторингу за якістю отримуваних трансгенних організмів і перш за все – за складом і властивостями білкових компонентів новостворених генотипів, що дозволяє заздалегідь, ще на етапі створення ГМО, виявляти небезпечні для людини і довкілля генотипи і не допускати їх випуску із лабораторії для використання у виробництві та продовольчому оберті;

3. Відбором відомих, перевірених природних генів та їх регуляторних генетичних структур і створенням на їх основі векторів, що забезпечують отримання трансгенів із заданими властивостями.

Показники і методи оцінки біобезпеки ГМО та отримуваних із них продуктів.

Важливим етапом оцінки біобезпеки ГМО і отриманих з них харчових та інших продуктів є санітарно-гігієнічна експертиза, яку проводять за рядом показників: хімічний склад вихідних і трансгенних рослин, біологічній цінності і рівню засвоєння продуктів, приготуваних із ГМО, виявлення токсичних, канцерогенних, мутагенних і алергенних речовин у продуктах, отриманих на основі використання ГМО, оцінці впливу ГМО на репродуктивні функції тварин і людини.

Випробування генетично змінених рослин на біобезпеку здійснюють за наступними напрямками:

- перевірка генів, інтегрованих до геному рослин на здатність до успадкування та переносу до інших рослин,
- оцінка впливу нових генів на стійкість рослин до хвороб і шкідників;
- виявлення і аналіз характеру мінливості ґрунтової мікрофлори та інших складових біоценозу під впливом транс генних рослин.

Обов'язковою і вкрай важливою є медико-біологічна оцінка харчової продукції, отриманої із ГМО.

Питання для самоперевірки

1. В чому полягає різниця між ГМ-рослинами трьох поколінь?
2. В чому полягають переваги вирощування культур стійких до гербіцидів?
3. В чому полягають переваги вирощування стійких до комах культур?
4. Які існують аспекти потенційної небезпеки ГМО?
5. Які труднощі існують при введенні в ДНК реципієнтної клітини чужорідного донорського гена?
6. Чим обумовлена біобезпека у біоінженерії?
7. За якими напрямками здійснюють випробування генетично змінених рослин на біобезпеку?

8. Ферменти харчової промисловості. Продукти, що отримують за допомогою іммобілізованих ферментів

Використання біологічних процесів і агентів для отримання харчових продуктів і поліпшення їх якості – найдавніша галузь біотехнології. Як відомо, всі живі організми містять значну кількість (сотні і тисячі) ферментів, основна функція яких полягає у проведенні, прискоренні і регуляції практично всіх хімічних реакцій, необхідних для життєдіяльності організму.

Завдяки високій каталітичній активності і специфічності, деякі ферменти вже давно використовуються в різних галузях виробництва, в першу чергу – це комплексні ферментні препарати для гідролізу природних полімерів – білків, крохмалю, пектинів.

Протеолітичні ферменти продукуються грибами роду *Aspergillus*, *Penicillium*, бактеріями роду *Bacillus*, дріжджами роду *Saccharomyces*. Ці ферменти використовують при переробці тваринної сировини в м'ясній, молочній та рибній промисловості. Вони застосовуються як розм'якшувачі м'яса, прискорювачі дозрівання м'яса і риби. При проведенні слабого протеолізу з використанням набору специфічних ферментів відбувається незначна зміна структури м'яса, але воно стає якісно краще, значно м'якше. Особливо важливою є дія ферментів на білки сполучної тканини. У цьому випадку виявляється можливим значно повніше використовувати всі частини туші.

Зважаючи на брак сировини для отримання сичужного ферменту, в останні роки ведуться інтенсивні роботи з пошуку його замінників ферментами мікробного походження для сироробної промисловості. Проте всі вони поступають йому за здатністю до зсідання молока. Добрими згущувачами є протеази, отримані з штамів мікроскопічних грибів роду *Mucor* і бактерій родів *Bacillus*, *Pseudomonas* та ін. В даний час в сироварінні застосовується близько 10% реніну мікробного походження.

У пивоварному виробництві протеолітичні ферменти застосовують для усунення білкових помутнінь, а в хлібопеченні – для скорочення часу замісу тіста з пшеничного борошна з високим вмістом клейковини.

Протеолітичні ферменти використовують як добавки до миючих засобів, що дає високий ефект при усуненні білкових забруднень.

Амілолітичні ферменти продукують гриби роду *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* і бактерії роду *Bacillus*. Найбільшими споживачами є спиртова і пивоварна промисловості. Амілази мікробного походження додають при підготовці пивного сусла, при спиртовому бродінні, щоб перевести крохмаль у форму, засвоювану дріжджами. Тим самим можна прискорити або повністю замінити солодження зерна в пивоварінні. Крім того, амілолітичні ферменти застосовують у хлібобулочному виробництві для поліпшення структури м'якушки хліба.

Целюлолітичні ферменти, що гідролізують целюлозу, являють собою комплекс, що складається з декількох ферментів з різною специфічністю дії: ендоглюканази, екзоглюкозидази, β -глюкозидази та ін. Целюлази і гемицелюлази можуть бути отримані тільки за допомогою мікроорганізмів. Целюлази, що продукуються грибами роду *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, застосовують у спиртовій, харчовій, концентратній галузях, де сировиною є рослинні матеріали або відходи переробки рослин, наприклад, у виробництві розчинної кави.

Пектолітичні ферменти продукують гриби родів *Aspergillus* (*Aspergillus niger*), *Penicillium*, бактерії *Erwinia caratovora*, *Clostridium sp.* Пектиназу представляють комплекс ферментів, що складається з полігалактуранази, пектинметілестерази та ін. Ці ферменти використовують при виробництві освітлених соків з плодів і ягід, для освітлення вин. Застосування пектиназ у виробництві соків обумовлено тим, що вони каталізують гідроліз пектинових речовин рослинних клітин, тим самим звільняючи сік від клітинних структур. Застосування пектиназ у виноробстві збільшує швидкість фільтрації сусла, сприяє його освітленню і стабілізації. При цьому зростає вміст екстрактивних речовин, вітаміну С, флавоноїдів, що володіють Р-вітамінною активністю.

Найбільшого поширення набули препарати, в яких ферменти в активній формі прикріплені до нерозчинної основи (рис. 14). Такі ферментні препарати називають іммобілізованими. Перевагою їх застосування є можливість багаторазового використання. У цьому випадку оброблюваний розчин пропускають через основу з іммобілізованим ферментом.

Іммобілізовані ферменти. Років 20-25 тому вважалося, що використання іммобілізованих ферментів може докорінно змінити ферментну індустрію, особливо проблеми, пов'язані з дорожнечою і складністю виділення ферментів. Іммобілізовані ферменти знайшли найрізноманітніше використання в медицині, фармацевтичній, хімічній і харчовій промисловості, в аналітичних цілях, в якості ферментних електродів для визначення концентрації цукрів, амінокислот і інших сполук.

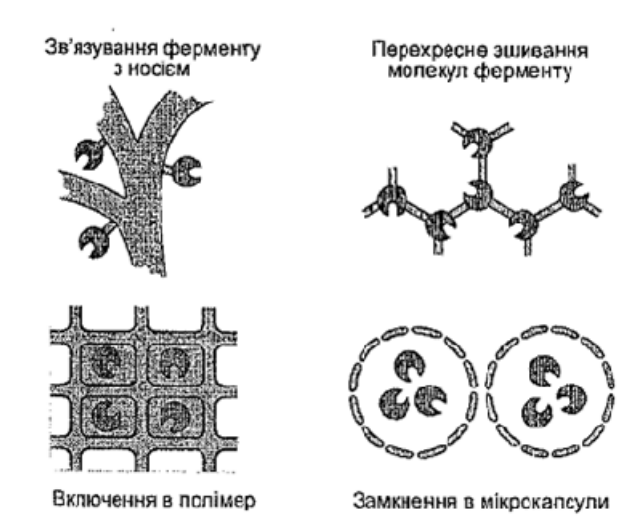


Рис. 14. Способи іммобілізації ферментів

Крім того, можливість використання іммобілізованих ферментів призвела до створення таких нових напрямків, як радіоімунний і ферментативний імуносорбентний аналіз. Однак, незважаючи на це, іммобілізовані ферменти не застосовуються в практичних цілях в таких масштабах, які передбачалися.

Переваги, якими володіють іммобілізовані ферменти в порівнянні зі своїми розчинними аналогами:

- іммобілізовані ферменти легко відділяються від реакційного середовища і можуть бути використані повторно;
- ферменти в іммобілізованому стані проявляють підвищену стабільність до екстремальних умов і зберігають активність протягом більш тривалого часу;
- використання іммобілізованих ферментів дозволяє розробляти безперервні технології;
- методами іммобілізації можливе створення мультиферментних іммобілізованих композицій. Це, у свою чергу, дозволяє здійснювати послідовні ферментні реакції різних процесів.

Іммобілізовані ферменти характеризуються і деякими недоліками. У результаті іммобілізації в ряді випадків спостерігається зменшення питомої активності системи. Відбувається це в силу різних причин. Наприклад, ковалентне зв'язування ферменту з носієм може втягувати у взаємодію який-небудь з амінокислотних залишків, що знаходиться в безпосередній близькості від активного центру. Іммобілізовані ферменти, завдяки фіксації ферментів на носії, не діють на нерухомі або нерозчинні субстрати (целюлоза, ксилан, лігнін та ін.).

Ще одним недоліком іммобілізованих ферментів є вартість іммобілізації, яка може виявитися неприйнятно високою. Таким чином, при використанні іммобілізованих ферментів доводиться вирішувати комплекс питань, пов'язаних з економічною обґрунтованістю їх практичної реалізації.

В даний час у світі розроблені наступні великомасштабні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів і клітин:

1. Отримання глюкозо-фруктозних сиропів.
2. Отримання оптично активних L-амінокислот з їх рацематних сумішей.
3. Синтез L-аспарагінової кислоти з фумарату амонію.
4. Синтез L-аланіну з L-аспарагінової кислоти.
5. Синтез L-яблучної кислоти з фумарової кислоти.
6. Отримання безлактозного молока.
7. Одержання цукрів з молочної сироватки.
8. Отримання 6-амінопеніцилланової кислоти.

Отримання глюкозо-фруктозних сиропів. Фруктоза (фруктовий, плодовий або медовий цукор) – найважливіший у фізіологічному і технологічному відношенні природний моносахарид. Вона в 2,5 рази солодше глюкози і в 1,7 рази солодше тростинного цукру (сахарози), завдяки чому фруктоза – менш калорійний харчовий продукт порівняно з останніми. На відміну від глюкози, обмін фруктози не контролюється інсуліном, тому фруктовий цукор може споживатися хворими на діабет. Фруктоза практично не викликає карієсу зубів. У суміші з глюкозою фруктоза не кристалізується, тому широко використовується для виробництва кондитерських виробів.

Однак, незважаючи на явні переваги використання фруктози, перша промислова установка для перетворення глюкози у фруктозу за допомогою іммобілізованої глюкоїзомерази була запущена лише в 1973 р (компанія «Клінтон Корн», США). Початковою сировиною для цього процесу служить глюкоза, яку отримують при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю у присутності мінеральних кислот. Комерційні препарати іммобілізованої глюкоїзомерази мають вигляд гранул, кульок, волокон або аморфної маси. Найбільш ефективними біореакторами для отримання фруктози визнані апарати колонного типу висотою близько 5 м, в яких порівняно з реакторами перемішування витрата ферменту мінімальна. Продуктивність такого реактора варіює від 600 до 9000 кг глюкозо-фруктозного сиропу на 1 кг іммобілізованого ферменту в залежності від чистоти вихідної сировини, а час напівінактивності каталізатора - 20-50 діб. Глюкозо-фруктозну суміш широко застосовують для виробництва тонізуючих напоїв, консервованих фруктів, кондитерських виробів, хліба, морозива та ін. Економічні розрахунки показали, що виробництво глюкозо-фруктозних сиропів з використанням іммобілізованої глюкоїзомерази в 1,5 рази вигідніше отримання сахарози з цукрового буряка за традиційною технологією.

Отримання L-амінокислот з їх рацемічних сумішей. Поряд з мікробіологічними способами важливе значення мають хімічні методи промислового отримання природних амінокислот, у тому числі незамінних. Проте в результаті хімічних реакцій, що використовуються для синтезу амінокислот, що містять асиметричні атоми вуглецю, з однаковою

швидкістю утворюються як D-, так і L-стереоізомери, тобто завжди виникає рацемічна суміш. Тим часом в живих клітинах обміну піддаються лише L-амінокислоти. Розподілення рацемічних сумішей на їх оптичні ізомери (представляє важку задачу) стало першим промисловим процесом з використанням іммобілізованих ферментів. Цей процес був здійснений в Японії в 1969 р. (компанія «Танабе Сейяку») за допомогою аміноацілази, іммобілізованої на ДЕАЕ-целюлозі (диетиламіноетилова целюлоза – похідна целюлози). В якості вихідних сполук у даному перетворенні використовують суміш D- і L-амінокислот, отриману за допомогою хімічного синтезу. Внаслідок своєї стереоспецифічності аміноацілаза гідролізує лише L-стереоізомер, в результаті чого розчинність L-амінокислоти, що утворюється, різко зростає і її легко можна відокремити від свого антипода фізико-хімічними методами. При нагріванні D-амінокислота, що залишилася, рацемізується, тобто перетворюється у вихідну суміш, яка знову піддається впливу ферменту.

Аміноацілаза строго специфічна до структури тільки ацильної частини субстрату, тому одна й та ж установка з іммобілізованим ферментом використовується для отримання різних амінокислот, у тому числі L-валіну, L-метіоніну, L-фенілаланіну і L-триптофану. Час напівінактивації іммобілізованого ензиму складає 65 діб; на японських підприємствах він використовується без заміни більше 8 років і забезпечує зниження вартості виробництва амінокислот на 40% у порівнянні з технологією, де застосовуються вільні молекули ферменту.

Отримання L-аспарагінової кислоти. Аспарагінова кислота широко застосовується в якості харчової добавки (підсолоджувач і підкислювач). Перша в світі промислова установка для синтезу L-аспарагінової кислоти з одержуваного хімічним шляхом фумарату амонію була запущена в 1973 р. в Японії (фірма «Танабе Сейяку»); в ній використані іммобілізовані в поліакриламідному гелі клітини кишкової палички *E. coli*, що містять аспартат-аміак-ліази.

Питання для самоперевірки

1. Які види ферментних препаратів використовуються в різних галузях виробництва?
2. Що таке «іммобілізовані» ферменти?
3. Якими перевагами володіють іммобілізовані ферменти?
4. Які існують способи іммобілізації ферментів?
5. Якими недоліками характеризуються іммобілізовані ферменти?
6. Які великомасштабні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів і клітин розроблені?
7. В чому полягає особливість отримання L-амінокислот з їх рацемічних сумішей?

9. Мікроорганізми в якості контролю забруднення. Біотехнологічна деградація нафтових забруднень

На сьогодні проблема забруднення навколишнього природного середовища нафтою і нафтопродуктами є дуже серйозною. В Україні виявлено багато районів із перевищенням гранично допустимих концентрацій нафтопродуктів не лише у воді, але і в ґрунтах (зокрема, в ґрунтах аеродромів, нафтобаз, нафтосховищ, нафтопереробних заводів, нафтових свердловин, автостоянок, автозаправок). У деяких регіонах забруднення стало вже настільки критичним, що нафтопродукти, які потрапили у ґрунти і підземні води, стали не лише отруйними, але й пожежонебезпечними.

Споживання нафти в Україні в останні роки становило 25-30 млн т, що зумовило щільну мережу об'єктів нафтопродуктозабезпечення по всій території. Нафтохімічне навантаження по областях відрізняється у 4 рази, а еколого-геологічний ризик – у 2 рази. Це свідчить про те, що практично вся територія України знаходиться під загрозою нафтохімічного забруднення. Площа забрудненої нафтопродуктами території перевищує 30 тис. га. Найбільш вразливими є підземні води, що мають надзвичайно велике значення для забезпечення населення якісною питною водою.

Джерелом забруднення можуть стати об'єкти нафтопродуктозабезпечення, тобто всі споруди, що пов'язані з видобуванням, зберіганням та очищенням нафти і стоків, переробкою нафти, транспортуванням нафти і нафтопродуктів та їх споживанням, транспорт, а також забруднені атмосферні опади. Дані наведені в таблиці 1 свідчать, що основна частина забруднень приходить на транспортування нафти. Звичайні танкерні операції (завантаження баласту, звільнення від баласту, завантаження та розвантаження нафти), а не аварій, супроводжуються великими втратами нафти.

Більшість синтетичних органічних речовин, у тому числі й нафтопродукти, можуть підлягати біодеградації, що робить біологічні методи очищення альтернативним вирішенням багатьох екологічних проблем, пов'язаних із забрудненням навколишнього природного середовища такими шкідливими речовинами. Мікроорганізми володіють таким метаболічним апаратом, який дозволяє їм використовувати нафту і нафтопродукти як джерело карбону та енергії.

Нафтопродукти – це комплексна суміш хімічних речовин. Наприклад, бензин, авіапальне, дизельне пальне, мазут і мінеральні смоли (дьоготь) містять кілька сотень складників. Кожен із цих складників має свої індивідуальні фізичні, хімічні та біологічні властивості.

Вуглеводні у навколишньому середовищі можуть розкладатися головним чином бактеріями, водоростями, дріжджами та грибами (рис. 15, 16).

Джерела забруднення нафтою

Джерело забруднення	Загальна кількість, млн. т/рік	Частка, %
Транспортні перевезення, в тому числі:	2,13	34,9
—загальні перевезення	1,83	30,9
—катастрофи.	0,3	4,9
Винос річками	1,9	31,1
Надходження з атмосфери	0,6	9,8
Природні джерела	0,6	9,8
Промислові відходи	0,3	4,9
Міські відходи	0,3	4,9
Відходи прибережних очисних заводів	0,2	3,3
Видобуток нафти у відкритому морі, в тому числі:	0,08	1,3
— звичайні операції	0,02	0,3
— аварії	0,06	1,0
Разом	6,11	100

Окремі мікроорганізми можуть метаболізувати лише обмежену кількість вуглеводневих субстратів. Сукупність різних мікроорганізмів з усіма можливими ензиматичними властивостями може ефективніше, ніж поодинокі мікроорганізми, руйнувати комплексну суміш вуглеводнів у ґрунті, прісній і морській воді.



Рис. 15. Гриби у боротьбі із нафтовим забрудненням

Найважливішими в біодеградації вуглеводнів у ґрунтах та морській воді є бактерії *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* spp. та корінеформи.

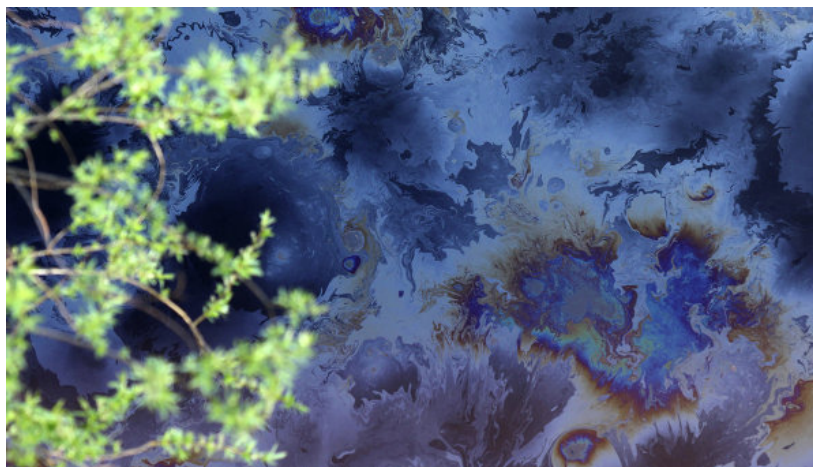


Рис. 16. Бактерії *Alcanivorax borkumensis* і *Oleispira antarctica*, здатні до споживання та вилучення з вуглеводнів енергії

Серед дріжджів і грибів, здатних розкласти вуглеводні, з морської води виділені *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* spp., із ґрунтів – *Trichoderma* та *Mortierella* spp. Виявлено, що виділені з ґрунту і водного середовища гриби *Aspergillus* та *Penicillium* spp. також можуть руйнувати вуглеводні.

Відомо, що розлита нафта формує на воді плівку. Нафта може перемішуватися з водою під впливом вітру та хвиль, у результаті чого утворюється емульсія.

Дисперсія вуглеводнів у такій емульсії збільшує поверхню стикування нафтопродуктів з оточуючим середовищем і, таким чином, підвищує можливість мікробної атаки цих вуглеводнів. Проте через великий діаметр частинок нафти у воді співвідношення поверхні до об'єму цих частинок залишається низьким, що призводить до пригнічення біодеградації нафтопродуктів у водному середовищі.

Ключовою відмінністю між біодеградацією нафтопродуктів, розлитих у ґрунт і водне середовище, полягає у їхній здатності до розповсюдження у присутності відповідних речовин, які можуть змінювати фізичні та хімічні властивості нафтопродуктів і їхню чутливість до деградації мікроорганізмами. Нафта, розлита на ґрунт, частіше переміщується вертикально в глибину ґрунту і рідше формує плями за рахунок горизонтального розтікання. Просочування нафти у ґрунт заважає випаровуванню летких вуглеводнів, які можуть бути токсичними для мікроорганізмів. Тверді часточки ґрунту можуть зменшувати токсичність компонентів нафтопродуктів, абсорбуючи їх. Проте абсорбція і адсорбція вуглеводнів до гумусної субстанції може зумовлювати формування стійких комплексів вуглеводнів із компонентами ґрунту.

На біодеградацію нафтопродуктів впливає температура та рН середовища. Низькі температури збільшують в'язкість нафти, зменшують летучість токсичних коротколанцюгових алканів і збільшують їхню розчинність у воді. Усе це пригнічує біодеградацію нафтопродуктів. Лише

незначні кількості нафти можуть підлягати біодеградації в арктичних льодовиках і заморожених ґрунтах тундри. Підвищені температури (від 30 до 40°C) збільшують швидкість метаболізму вуглеводнів до максимуму, але підвищують токсичну дію вуглеводнів на мембрани клітин. Стійкими до таких умов є термофільні алканутилізуєчі бактерії.

Викиди вуглеводнів у водне середовище, яке містить низьку концентрацію неорганічних поживних речовин, часто призводять до підвищення співвідношення карбон/нітроген та/або співвідношення карбон/фосфор у середовищі, що, у свою чергу, може не дуже позитивно впливати на ріст і поділ мікроорганізмів. Додавання фосфату сечовини, комбінованих азотно-фосфорно-калійних добрив або солей амонію і ортофосфорної кислоти у ґрунт може суттєво посилювати біодеградацію цих нафтопродуктів.

Вуглеводневий метаболізм мікроорганізмів зменшується з підвищенням концентрації солі. Даний ефект спостерігався для водних середовищ із концентрацією солі від 3,3 до 28,4% і є наслідком зниження загального рівня метаболізму мікроорганізмів у таких умовах.

Тиск відіграє важливу роль в біодеградації вуглеводнів у глибоководних умовах. Досліджено деградацію тетрадекану, гексадекану і суміші вуглеводнів під впливом бактерій при тиску 1 атм. і 495-500 атм. При 4°C 94% гексадекану було утилізовано лише через 40 тижнів інкубування бактерій при високих тисках, тоді як при 1 атм. деградація відбувалася за 8 тижнів. Тому нафтопродукти, які перебувають у морях і океанах на великих глибинах, деградують під впливом бактерій дуже повільно, і стійкі фракції нафти можуть зберігатись у таких умовах кілька десятків років.

Була розроблена технологія прискореного розмноження бактерій, що існують в морі, які здатні розкладати вуглеводні. Для прискорення біорозкладання забруднена поверхня вкривалася мікроемульсією, що містить суміш вуглецю, азоту і фосфору. Як виявилось, додавання цих речовин стимулює розмноження корисних бактеріальних штамів. Проведені експерименти виявили, що при використанні нового методу, із забрудненої поверхні протягом тижня зникло 70-90% вуглеводнів в порівнянні з 12-20% на необроблених місцях. Після кожної операції щільність фітопланктону збільшувалась. Перевага біологічного процесу полягає головним чином в тому, що він не викликає появи нового забруднюючого агенту в навколишньому середовищі. Мікробна біомаса, що створюється при розмноженні бактерій на плівках, слугує кормом для морських істот. Нова технологія використовується як у морях, так і в болотах і лагунах, куди важко добратися, а також для контролю випадкових забруднень, наприклад, в акваторіях портів.

В наш час проводяться дослідження, що спрямовані на розробку процесу, який забезпечує стимуляцію росту великій кількості груп морських бактерій, що здатні руйнувати вуглеводні. Крім того, важливе значення має

пошук і створення нових штамів бактерій, які спроможні існувати, швидко рости і розмножуватися при відносно низьких температурах у морській воді.

Питання для самоперевірки

1. Які існують джерела забруднення нафтою?
2. В чому полягає відмінність між біодеградацією нафтопродуктів, розлитих у ґрунт і водне середовище?
3. Які показники впливають на біодеградацію нафти?
4. Яким чином можливо прискорити біорозкладання забрудненої нафтою поверхні?

10. Біотехнологія і енергетика

Традиційні джерела енергії сьогодні не задовольняють зростаючі потреби сучасного суспільства. Необхідно знайти нові масштабні, легко відновлювальні екологічні і дешеві джерела енергії. Їх трансформація в технічно зручні види палива має декілька шляхів. Одним з них є біологічна конверсія органічних відходів і біомаси в цілому, як продукту фотосинтезу, в тверді, рідкі, газоподібні види палив та електроенергію.

Біогаз як екологічне пальне. Одним з пріоритетних механізмів у світі стали сучасні біотехнологічні підходи утилізації відходів у біогаз та добрива.

Біогаз складається з метану і водню до 40-90% і на 60-10% з вуглекислого газу. Визначено, що в якості сировини для виробництва біогазу може використовуватись будь-який біологічний продукт: органічні добрива (гній, пташиний послід, змивка від тварин), відходи землеробства (солота, кукурудзяний силос, бурякове і картопляне бадилля, листя), агропромислові відходи (яблучна та кукурудзяна барда, відходи від виробництва спирту, очистки овочів, фруктів тощо), відходи від забою свійських тварин, а також комунальні біовідходи.

В основі роботи біогазових установок (БГУ) закладені біологічні процеси бродіння та розкладання органічних речовин під впливом метанутворюючих бактерій в анаеробних умовах, які характеризуються відсутністю вільного кисню, високої вологості і температурного середовища 15-20°C для психрофільних, 30-40°C для мезофільних і 50-70°C для термофільних бактерій (рис. 17).

Продуцентами метанового бродіння є складні мікробні асоціації, що включають такі групи: *аеробні бактерії*, які перетворюють продукти деструкції целюлози; анаеробні ацетогенні бактерії *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, які ферментують утворені первинні метаболіти бродіння; метанутворюючі бактерії *Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungati*, для яких вищеназвані сполуки є подальшими поживними субстратами.

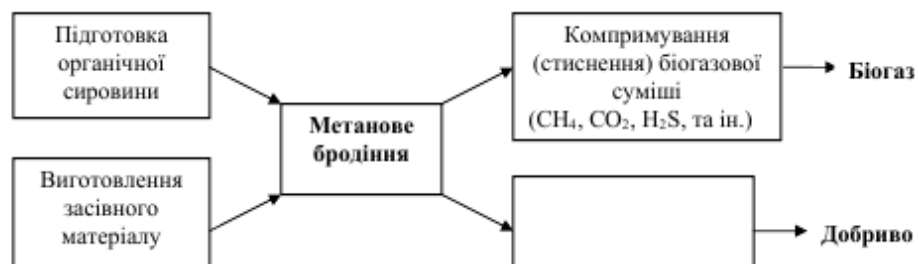


Рис. 17. Блок-схема виробництва біогазу на основі органічного субстрату

Усі метанові бактерії належать до анаеробів. Отже, природний процес розкладання органічних речовин субстрату за їх участю можливий лише без доступу кисню.

Субстратами для життєдіяльності кожної групи бактерій слугують певні органічні речовини, а саме: для бактерій-аеробів – полісахариди (целюлоза, геміцелюлоза); для ацетогенів – продукти деструкції целюлози (янтарна, пропіонова, масляна, молочна, оцтова кислоти, спирти, CO_2 і H_2); для метаногенів – ацетат (оцтова), форміат (мурашина) кислоти, CO_2 та H_2 .

На останньому етапі продукти життєдіяльності метанових бактерій – ацетат, діоксид вуглецю та водень, перетворюються переважно на метан (90% цього газу утворюється саме в цей момент).

Слід зазначити, що попередній третій етап біосинтезу оцтової кислоти найбільш важливий, бо зумовлює швидкість процесу метанутворення. Оптимальний рівень рН при цьому підтримується на рівні 7 (коливання можуть відбуватися в діапазоні 6,6-8,0).

Анаеробне бродіння здійснюється в герметичній ємності – реакторі звичайної циліндричної форми горизонтального або вертикального розташування. Для ефективного бродіння в порожнині реактора необхідно підтримувати постійну температуру відповідно до прийнятого режиму бродіння: мезофільного або термофільного і здійснювати регулярне перемішування зброджуваної сировини.

Найбільш ефективними вважаються біореактори, що працюють у термофільному режимі. На таких установках з триденною ферментацією гною вихід біогазу становить 4,5 л на кожен літр корисного об'єму реактора. Об'ємна теплота згоряння біогазу складає 22 МДж/м³.

Перероблені анаеробними методами органічні відходи є цінним біодобривом, здатним підвищувати родючість ґрунтів – одного з найбільш цінних ресурсів держави, а також підвищувати конкурентоспроможність сільськогосподарської продукції (рис. 18).

Одна свиноматка із 20-24 поросятами дає у рік приблизно 25 м³ гною. У газовому еквіваленті це становить у середньому 1000 м³ біогазу. Економічно вигідно встановлювати біогазову установку на свинокомплексах з поголів'ям не менше 10-12 тис. свиней (650 свиноматок). Одна дійна корова щодня дає від 30 до 70 кг гною, що у середньому на рік дорівнює 20 м³, а це

800 м³ біогазу. БГУ буде економічно ефективною для ферм із поголів'ям від 800 дійних корів.

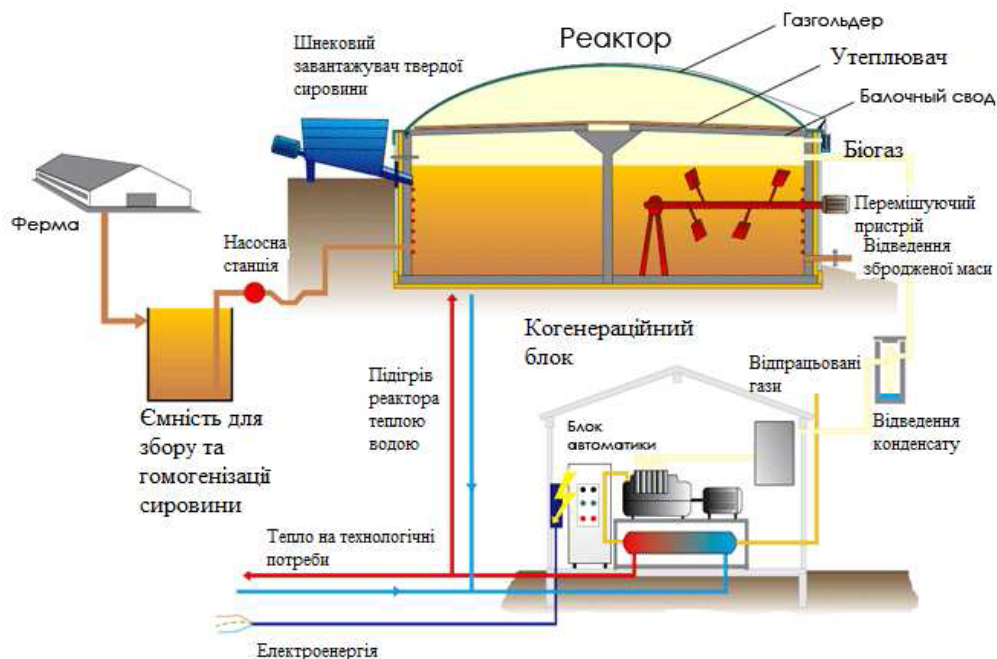


Рис. 18. Технологічна схема отримання біогазу, добрива та електроенергії з тваринницьких відходів у сільському господарстві

Біогазова установка приносить "доходи з відходів" або "гроші з гною". БГУ – це найактивніша система очищення, яка дуже швидко самоокуповується і дає прибуток. Сировиною може бути гній великої рогатої худоби, свиней, пташиний послід, відходи боєнь (кров, жир, кишки), рештки рослин, силос, прогниле зерно, каналізаційні стоки, жири, біосміття, відходи харчової промисловості, садові відходи, солодовий осад, вичавки, буряковий жом, технічний гліцерин (від виробництва біодизелю). Більшість видів сировини можна змішувати з іншими видами. Отже, БГУ одночасно та у великих кількостях може: утилізувати біовідходи, виробити біогаз, електроенергію, тепло, добрива, заощадити капітальні витрати (при будівництві нових комплексів).

Усе наведене вище виробляється за мінімальної собівартості, адже за біосміття не потрібно платити, а сама установка для власних потреб використовує лише 10-15% виробленої енергії.

Якщо на підприємстві утворюється 1 т гною щодня, то за рік на ньому можна отримати як мінімум 60-70 тис. грн, тобто окупність установки переробки гною вражає: 2-3 роки, а для деяких інших видів сировини – 1 рік. Біогаз може використовуватись як газ для опалення та вироблення електроенергії, і, порівняно з використанням звичайного природного газу, він низьковартісний.

З 1 м³ біогазу в генераторі можна виробити 2 кВт електроенергії, яка постачатиметься без перепадів. Тепло від охолодження генератора або від

згоряння біогазу можна використовувати для опалення, сушіння насіння, дров, кип'ятіння води для утримання худоби. Тепло отримують під час спалювання газу спеціально, а також відбирають його при охолодженні електрогенератора. Поряд з БГУ можна встановлювати теплиці. Тепло також може використовуватись для приведення в дію випарників рефрижераторів (при охолодженні свіжого молока на молочних фермах або для зберігання м'яса, яєць тощо).

Під час конверсії відходів у біогаз відбувається знешкодження відходів, розклад складних полімерів до простих сполук, більш відновлених і доступних для рослин. Таким чином, заброджена біомаса після метантенка за багатьма показниками в кілька разів краще за інші добрива (нативні гній, послід, торф та хімічні). Ось деякі з цих показників:

- відсутність насіння бур'янів;
- відсутність патогенної мікрофлори;
- наявність активної мікрофлори, яка сприяє інтенсивному росту рослин. В забродженій масі після метантенку міститься біля 10^{14} колоній мікрофлори на грам, при цьому повністю відсутня патогенна мікрофлора;
- відсутність адаптаційного періоду. Заброджені добрива завдяки своїй формі починають ефективно працювати відразу після внесення у ґрунт;
- добриво у вигляді забродженої маси, в порівнянні з нативним гноєм, вимивається з ґрунту не більше 15%. Таким чином, внесені на поля у невеликій кількості заброджені добрива не втрачають свою ефективність на 3-5 років довше, ніж звичайні добрива;
- максимальне збереження і накопичення азоту. Завдяки анаеробному зброджуванню органічних відходів у біогазовій установці кількість загального азоту зберігається повністю, крім того, вміст розчинного азоту NH_4 збільшується на 10-15%;
- заброджені органічні добрива є екологічно-чистими добривами.

Технологічні схеми БГУ бувають різними, залежно від виду і кількості перероблюваних субстратів, від виду та якості кінцевих цільових продуктів і ряду інших чинників. Найбільш поширеними на сьогодні є схеми з одноступеневим зброджуванням декількох видів субстратів, одним з яких, зазвичай, є гній. У випадку технологічної необхідності ефективною переробки окремих видів субстратів і підвищення загальної ефективності використання робочого об'єму біореакторів застосовують дво- або тріступеневі схеми.

Україна має значний потенціал біологічних ресурсів для виробництва біогазу, використання якого надасть змогу забезпечити 4-7% річних енергетичних потреб країни. За даними Агентства з відновлюваної енергетики, у 2000 р. обсяг використання біогазу в Україні склав 0,02 ТВт·год, причому в перспективі прогнозується суттєве зростання даного показника: в 2030 р. – до 10,2 ТВт·год/рік, у 2050 р. – до 17,4 ТВт·год/рік.

В Україні є поодинокі приклади впровадження біогазових технологій. Перша установка була побудована у 1993 році на свинофермі

“Запоріжсталь”. Наступними стали компанії “Агро-Овен” (Дніпропетровська обл.), “Еліта” (Київська обл.), “Українська молочна компанія” (“УМК”).

На даний час в Україні побудовано та на стадії завершення будівництва знаходиться 7 об’єктів із виробництва біогазу з відходів тваринництва у Дніпропетровській, Івано-Франківській, Київській, Одеській, Харківській, Херсонській областях.

Працюють також біогазові установки на полігонах твердих побутових відходів у Львові, Маріуполі, Кременчуці, Луганську, Києві, а також у Бортницькій станції очищення стічних вод (м. Київ).

Питання для самоперевірки

1. Які біологічні продукти можна використовувати в якості сировини для виробництва біогазу?
2. Які групи бактерій є продуцентами метанового бродіння?
3. Які проблеми вирішуються при використанні біогазових установок?
4. Які кінцеві продукти можна отримати при використанні біогазових установок?
5. Які переваги має добриво, отримане після біометаногенезу, у порівнянні зі звичайними добривами?

Список використаної літератури

1. Андреева Л. Е. Трансгенные животные: фундаментальные и прикладные аспекты / Л. Е. Андреева, В. З. Тарантул; [в кн. Проблемы и перспективы молекулярной генетики. Том 1] ; отв. ред. Е. Д. Свердлов. – М. : Наука, 2003. – 372 с.
2. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию / М. Е. Бекер ; [пер. с лат.]. – Рига : Пищевая промышленность, 1978. – 232 с.
3. Біотехнологія : підруч. / [В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.] ; за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
4. Биотехнология : учебное пособие для вузов. В 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – М. : Высш.шк., 1987
5. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : изд-во Сибир. отдел. РАН, 1999. – 252 с.
6. Глик Б. Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
7. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко и др. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.
8. Патрушев Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2000. – 830 с.
9. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник для вузов / В. Н. Рыбчин . – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : изд-во СПбГТУ. 2003. – 522 с.
10. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон ; под ред. В. Г. Дебабова ; [пер. с англ.]. – М. : Мир, 1987. – 411 с.
11. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха – М. : Высш. шк., 2003. – 470 с.
12. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособ. / С. Н. Щелкунов. – 2-е изд. испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. унив., 2004. – 496 с.
13. Эрнст Л. К. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева // Вестник РФФИ. – 2002. – №3. – С. 12.
14. Юлевич О. І. Біотехнологія : курс лекцій / О. І. Юлевич. – Миколаїв : МДАУ, 2007. – 156 с.
15. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладач: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.7,06

Тираж 30 прим. Зам.№ _____

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м.Миколаїв, вул. Паризької комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.