



Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Рязанский государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

Утверждено решением ученого совета  
Протокол № 1 от 01.09.2023 г.

Фонд оценочных средств по дисциплине	«Биотехнология»
Образовательная программа	Основная профессиональная образовательная программа высшего образования - программа специалитета по специальности 33.05.01 Фармация
Квалификация	Провизор
Форма обучения	Очная

Разработчик (и): кафедра фармацевтической технологии

ИОФ	Ученая степень, ученое звание	Место работы (организация)	Должность
А.Н. Николашкин	канд. фарм. наук, доц.	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	заведующий кафедрой фармацевтической технологии
Р.М. Стрельцова	к.ф.н., доцент	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	Доцент кафедры фармацевтической технологии
У.Н. Буханова	-	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии

Рецензент (ы):

ИОФ	Ученая степень, ученое звание	Место работы (организация)	Должность
С.В. Дармограй	к.ф.н., доцент	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	доцент
О.В. Евдокимова	к.м.н., доцент	ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России	заведующий кафедрой микробиологии

Одобрено учебно-методической комиссией по специальности Фармация и Промышленная фармация

Протокол № 11 от 26.06.2023г.

Одобрено учебно-методическим советом.

Протокол № 10 от 27.06.2023г.

**Фонды оценочных средств  
для проверки уровня сформированности компетенций (части компетенций)  
по итогам освоения дисциплины**

**1. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости**

**Примеры заданий в тестовой форме:**

**Тестовые задания к занятию «Пути и методы, используемые при получении более продуктивных биообъектов, и биообъектов с другими свойствами»**

1. Возникновение геномики как научной дисциплины стало возможным после
  - а) установления структуры ДНК
  - б) создания концепции гена
  - в) дифференциации регуляторных и структурных участков гена
  - г) полного секвенирования генома у ряда организмов
  
2. Для получения протопластов из клеток грибов используется
  - а) лизоцим
  - б) трипсин
  - в) улиточный фермент
  - г) пепсин
  
3. Для получения протопластов из бактериальных клеток используется
  - а) лизоцим
  - б) улиточный фермент
  - в) трипсин
  - г) папаин
  
4. Полиэтиленгликоль (ПЭГ), вносимый в суспензию протопластов:
  - а) способствует их слиянию
  - б) предотвращает их слияние
  - в) повышает стабильность суспензии
  - г) предотвращает микробное заражение
  
5. Биотехнологу "ген-маркер" необходим
  - а) для повышения активности рекомбинанта
  - б) для образования компетентных клеток хозяина
  - в) для модификации места взаимодействия рестриктаз с субстратом
  - г) для отбора рекомбинантов

**Эталон ответа:** 1 – Г; 2 – В; 3 – А; 4 – А; 5 – Г.

**Критерии оценки тестового контроля:**

Оценка «отлично» выставляется при выполнении без ошибок более 85 % заданий.

Оценка «хорошо» выставляется при выполнении без ошибок более 65 % заданий.

Оценка «удовлетворительно» выставляется при выполнении без ошибок более 50 % заданий.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется при выполнении без ошибок равного или менее 50 % заданий.

**Примеры контрольных вопросов для собеседования:**

1. Определение биотехнологии как науки и сферы производства. Направления применения биотехнологии в народном хозяйстве.
2. Связь биотехнологии с фундаментальными науками, инженерно-технологической базой.
3. История и этапы развития биотехнологии.
4. Аспекты использования биотехнологии в производстве лекарственных средств.
5. Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических препаратов. Классификация биообъектов.

#### **Критерии оценки при собеседовании:**

- Оценка "отлично" выставляется студенту, если он глубоко и прочно усвоил программный материал, исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно его излагает, умеет тесно увязывать теорию с практикой, свободно справляется с задачами, вопросами и другими видами применения знаний, причем не затрудняется с ответом при видоизменении заданий, использует в ответе материал монографической литературы, правильно обосновывает принятое решение, владеет разносторонними навыками и приемами выполнения практических задач.
- Оценка "хорошо" выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос, правильно применяет теоретические положения при решении практических вопросов и задач, владеет необходимыми навыками и приемами их выполнения.
- Оценка "удовлетворительно" выставляется студенту, если он имеет знания только основного материала, но не усвоил его деталей, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, испытывает затруднения при выполнении практических работ.
- Оценка "неудовлетворительно" выставляется студенту, который не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с большими затруднениями выполняет практические работы. Как правило, оценка "неудовлетворительно" ставится студентам, которые не могут продолжить обучение без дополнительных занятий по соответствующей дисциплине.

#### **Примеры ситуационных задач:**

##### **Ситуационная задача № 1.**

Проконсультируйте специалиста, обратившегося с вопросом оценки подлинности, допустимых примесей и количественного определения препарата инсулина человека, получаемого по технологии рекомбинантной ДНК через проинсулин.

**Эталон ответа.** Рекомбинантный инсулин, синтезируемый в микробной клетке E.Coli идентичен инсулину человеческой ткани. Однако его выделение из клетки требует ее разрушения. При этом его выделение и очистка требуют особой тщательности с целью удаления различных примесей в том числе микробных липо- и гликопротеинов. Примеси в рекомбинантном инсулине вследствие их токсичности могут вызвать нежелательные побочные эффекты.

В этой связи в рекомбинантном инсулине определяются и нормируются иммунореактивные полипептиды, проинсулинподобная иммунореактивность (методом РИА), ДНК штамма продуцента (метод гибридизации), А-21-дезамидоинсулин и другие

родственные соединения (ВЭЖХ), высокомолекулярные белки (ВЭЖХ), бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест). Идентификация инсулина проводится с использованием методов ВЭЖХ, пептидного картирования, биологическим методом.

Количественное определение проводится методом ВЭЖХ, кроме того, оценивается биологическая активность (гипогликемическое действие).

### **Ситуационная задача №2.**

Дайте объяснение факту, описанному в литературе. После применения людьми пищевой добавки аминокислоты триптофана, у людей отмечалось резкое увеличение встречаемости эозонофиллии – миалгии, сопровождающейся изнурительными мышечными болями и спазмом дыхательных путей.

Триптофан был получен методом биосинтеза с помощью генетически трансформированных бактерий. Для сверхсинтеза триптофана компания сочла, что новый штамм идентичен предыдущему и не провела валидацию.

**Эталон ответа.** На биотехнологическом предприятии может происходить замена штамма продуцента. Часто это «дочерний» штамм, полученный генетиками из штамма, уже используемого предприятием, но образующий больше целевого продукта, т.е. более рентабельный. В этом случае обязательна валидация, хотя она требует затраты сил, времени и средств.

Более высокая активность нового продуцента означает наличие изменений в его метаболизме. Эти изменения могут приводить не только к большей продуктивности, но и к сдвигам в наборе и концентрации ряда метаболитов у продуцента.

Схема выделения и очистки целевого продукта, согласно регламенту, может в новых условиях оказаться неудовлетворительной. Это может привести к появлению в готовом продукте токсичных примесей.

В описанном случае триптофан содержал метаболиты триптофана, в том числе 1-1'-этилен-бис-триптофан, который в опытах на крысах показал патологию сходную с симптомами при применении триптофана у людей.

### **Ситуационная задача № 3.**

Химическую иммобилизацию стрептокиназы проводили следующим образом: в качестве полимера – носителя использовали декстрол с молекулярной массой 60 000. Приготовили раствор дектрола, приготовили раствор стрептокиназы, затем к раствору стрептокиназы добавили раствор дектрола, перемешивали в течение часа. Однако химическая иммобилизация не произошла. Фермент не присоединился к поверхности носителя. Объясните, на каком этапе была допущена ошибка.

**Эталон ответа.** Фермент не присоединился к носителю в результате отсутствия на его поверхности реакционных групп, способных связаться с белком. Необходимо предварительно провести активацию поверхности дектрола, обработав его перйодатом калия. При этом спиртовые группы окисляются до альдегидных, которые затем взаимодействуют с аминокруппами фермента с образованием азометиловой связи.

### **Критерии оценки при решении ситуационных задач:**

- Оценка «отлично» выставляется, если задача решена грамотно, ответы на вопросы сформулированы четко. Эталонный ответ полностью соответствует решению студента, которое хорошо обосновано теоретически.

- Оценка «хорошо» выставляется, если задача решена, ответы на вопросы сформулированы не достаточно четко. Решение студента в целом соответствует эталонному ответу, но не достаточно хорошо обосновано теоретически.

- Оценка «удовлетворительно» выставляется, если задача решена не полностью, ответы не содержат всех необходимых обоснований решения.
- Оценка «неудовлетворительно» выставляется, если задача не решена или имеет грубые теоретические ошибки в ответе на поставленные вопросы

## **2. Оценочные средства для промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины *Биотехнология***

### **Форма промежуточной аттестации в 8 семестре - Экзамен с курсовой работой Порядок проведения промежуточной аттестации**

Экзамен проводится по билетам в форме устного собеседования. Студенту достается экзаменационный билет путем собственного случайного выбора и предоставляется 45 минут на подготовку. Защита готового решения происходит в виде собеседования, на что отводится 20 минут.

**Оценочные средства для проведения аттестации** – экзаменационные билеты. Экзаменационный билет содержит два теоретических вопроса и ситуационную задачу.

#### **Критерии выставления оценок:**

– Оценка «отлично» выставляется, если студент показал глубокое полное знание и усвоение программного материала учебной дисциплины в его взаимосвязи с другими дисциплинами и с предстоящей профессиональной деятельностью, усвоение основной литературы, рекомендованной рабочей программой учебной дисциплины, знание дополнительной литературы, способность к самостоятельному пополнению и обновлению знаний.

– Оценки «хорошо» заслуживает студент, показавший полное знание основного материала учебной дисциплины, знание основной литературы и знакомство с дополнительной литературой, рекомендованной рабочей программой, способность к пополнению и обновлению знаний.

– Оценки «удовлетворительно» заслуживает студент, показавший при ответе на экзамене знание основных положений учебной дисциплины, допустивший отдельные погрешности и сумевший устранить их с помощью преподавателя, знакомый с основной литературой, рекомендованной рабочей программой.

– Оценка «неудовлетворительно» выставляется, если при ответе выявились существенные пробелы в знаниях студента основных положений учебной дисциплины, неумение даже с помощью преподавателя сформулировать правильные ответы на вопросы экзаменационного билета.

#### **Требования к выполнению курсовой работы по *Биотехнологии*.**

Курсовая работа выполняется студентом под научным руководством преподавателя кафедры фармацевтической технологии. Выбор темы курсовой работы согласовывается с преподавателем кафедры. Изложение материала курсовой работы должно строго соответствовать плану.

Структура курсовой работы включает в себя:

1. **Титульный лист** с указанием министерства принадлежности образовательной организации, названия образовательной организации, кафедры, темы курсовой работы, исполнителя (обучающегося), преподавателя, которому сдана работа на проверку, дата сдачи работы.
2. **Отзыв проверяющего.** Заполняется преподавателем, проверяющим курсовую работу.

3. **Оглавление** с указанием плана работы, который должен содержать введение, название основных разделов и подразделов работы, заключение, список использованной литературы и нумерации страниц.

4. **Введение** раскрывает актуальность выбранной темы, теоретическое и практическое значение. Ставится цель работы. Формулируются задачи (не более 3 – 4), которые необходимо решить для достижения поставленной цели.

5. **Литературный обзор** (основная часть) раскрывается основное содержание плана. Подбор материала направлен на раскрытие основных положений выбранной темы. Обязательным являются ссылки на источники литературы (оформляются в квадратных скобках []), на авторов, чьи позиции, мнения, информация использованы в курсовой работе. Таблицы и графические объекты, необходимые для раскрытия темы могут помещаться непосредственно в текст основной части курсовой работы, если их объем не является чрезмерным. Основная часть курсовой работы, помимо почерпнутого из разных научных источников содержания, должна включать в себя собственное мнение обучающегося и сформулированные выводы по завершению каждого раздела, опирающиеся на приведенные факты. Указанные выводы рекомендуется начинать со слов «таким образом», «суммируя вышеизложенное» т.п.

6. **Практическая часть.** Содержание раздела должно отражать опыт работы отечественных и зарубежных биотехнологических предприятий-производителей лекарственных средств, соблюдение ими требований Правил надлежащей производственной практики (GMP) к биотехнологическому производству. Обязателен иллюстративный материал (аппаратурные и технологические схемы биотехнологических процессов; схемы, фото оборудования и др.) При описании оборудования указывается его название, марка, основные технические характеристики (спецификация), схема и принцип работы.

Если есть необходимость составления номенклатурного списка биотехнологических лекарственных средств, то он составляется на основании государственного реестра лекарственных средств в виде таблицы. Количество лекарственных средств, внесенных в номенклатурный список должно быть не менее 7. Предпочтение должно быть отдано препаратам отечественного производства, а также наиболее востребованным импортным ЛС.

7. **Заключение**, где формируются доказательные выводы на основании содержания исследуемого автором материала. Выводы по курсовой работе должны быть сформулированы в соответствии с поставленной целью и задачами.

8. **Список использованной литературы** и других источников к курсовой работе (не менее 15) оформляется в алфавитной последовательности в соответствии с ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись, библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления» и ГОСТ 7.82-2001 «Библиографическая запись. Библиографическое описание электронных ресурсов. Общие требования и правила составления». В него вносится весь перечень изученных в процессе написания курсовой работы: учебников; статей из журналов биотехнологического, фармацевтического профиля; сборников научных трудов и материалов конференций, Интернет-ресурсов, справочников и др. В нем указываются: фамилии автора, инициалы, название работы, место и время ее публикации.

Текст работы должен быть распечатан на принтере на одной стороне белого листа бумаги формата А4; через 1,5 интервала; шрифт TimesNewRoman; размер 14. Каждая страница текста должна иметь поля: левое – 25 мм, правое – 10 мм, верхнее и нижнее по 20 мм. Заголовки отделяются от основного текста пробелами в 1,5 интервала снизу, шрифт TimesNewRoman размер 12 – 14, полужирное начертание. Нумерация страниц производится последовательно с титульного листа и оглавления работы, при этом номера страниц проставляются с 3-ей страницы (с введения) внизу посередине страницы. Отступы всех абзацев должны быть по всей работе одинаковые и соответствовать 1,5 см.

### **Критерии оценки курсовой работы**

Выполненная курсовая работа представляется на кафедру преподавателю для проверки. Если представленная работа не соответствует предложенному плану курсовой (планы курсовых работ содержатся в данном пособии далее), преподаватель имеет право отказать студенту в приеме и проверке работы с выставлением оценки «неудовлетворительно». Преподаватель имеет право также потребовать доработать отдельные разделы работы.

Защита курсовой работы обязательна и предусматривает оценку знаний студентом материала, изложенного в курсовой работе, умение его анализировать. Контролируется уровень сформированности общепрофессиональных и профессиональных компетенций.

Итоговая оценка за курсовую работу выставляется в зачетную книжку студента и складывается из оценки, выставленной на защите и оценки за собственно курсовую работу (из отзыва проверяющего).

Оценка **«отлично»** выставляется при полном, всестороннем освещении темы, при проработке современной научной литературы по теме исследования, при наличии полностью и на достаточно высоком уровне выполненной практической части, отличном знании материала, а также при условии своевременной сдачи работы.

Оценка **«хорошо»** выставляется при таких же условиях, но имеются незначительные пробелы или в освещении темы или в знании материала, а также при недостаточной проработке литературы по теме курсовой работы. Оценка «хорошо» может быть выставлена в случае, если разделы практической части выполнены не полностью.

Оценка **«удовлетворительно»** выставляется при неполном освещении темы и пробелах в знаниях по нескольким разделам курсовой работы, а также при недостаточной проработке литературных источников по теме. При непоследовательном и нелогичном изложении материала курсовой работы. Оценка «удовлетворительно» также выставляется в случае выполнения практической части работы на низком уровне: не все разделы освещены или освещены поверхностно.

Оценка **«неудовлетворительно»** выставляется в случае, если работа выполнена не в соответствии с требованиями, в курсовой работе не раскрыты вопросы, указанные в теме, проработана только учебная литература, студент не знает материала темы и не может защитить работу. Оценка «неудовлетворительно» выставляется при отсутствии практической части курсовой работы или она выполнена не в соответствии с требованиями.

### **Фонды оценочных средств**

**для проверки уровня сформированности компетенций (части компетенций)  
для промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины *Биотехнология***

**В результате изучения дисциплины происходит комплексное освоение компетенций:**

**ОПК-1.** Способен использовать основные биологические, физико-химические, химические, математические методы для разработки, исследований и экспертизы лекарственных средств, изготовления лекарственных препаратов

**ПК-10.** Знать положения нормативных правовых актов Российской Федерации, регулирующих обращение лекарственных средств и других товаров аптечного ассортимента, в том числе в соответствии с Соглашением о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза; институциональные нормы в сфере управления фармацевтической деятельностью

**1) Типовые задания для оценивания результатов сформированности компетенции на уровне «Знать» (воспроизводить и объяснять учебный материал с требуемой степенью научной точности и полноты):**



Для оценивания результатов обучения в виде **знаний** используется следующий тип контроля: **контрольные вопросы для индивидуального собеседования или письменной работы**.

1. Определение биотехнологии как науки и сферы производства. Направления применения биотехнологии в народном хозяйстве.
  2. Связь биотехнологии с фундаментальными науками, инженерно-технологической базой.
  3. История и этапы развития биотехнологии.
  4. Аспекты использования биотехнологии в производстве лекарственных средств.
  5. Биотехнология и медицина. Получение биотехнологическими методами лекарственных, профилактических и диагностических препаратов.
  6. Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических препаратов. Классификация биообъектов.
  7. Макрообъекты животного происхождения. Основные группы получаемых БАВ.
  8. Биообъекты растительного происхождения. Основные группы получаемых БАВ.
  9. Биообъекты-микроуровня. Основные группы получаемых БАВ.
  10. Биообъекты- макромолекулы с ферментативной активностью.
  11. Основные «варианты» биотехнологий: биотехнологический процесс как базовый этап, как промежуточный, и как заключительный этап создания лекарственного средства.
- Примеры
12. Создание условий для поддержания жизнеобеспечения биообъекта и максимального синтеза целевого продукта в зависимости от варианта биотехнологии.
  13. Жизнеобеспечение культур клеток высших растений и животных. Феномен «тотипотентности». Факторы, влияющие на рост культуры клеток растений и животных. Проблемы лизогении и онкогенов при культивировании биообъектов.
  14. Техногенная экологическая ниша для существования микрообъектов в монокультуре. Типы биореакторов. Критерии подбора ферментеров при реализации конкретных целей.
  15. Классификация биосинтеза по технологическим параметрам, принципы организации материальных потоков: периодический, полупериодический, отъемно-доливной, непрерывный; глубинная, поверхностная ферментация, массообмен.
  16. Системный подход к планируемой работе биотехнологического производства. Иерархическая структура (ступени построения) биотехнологического производства.
  17. Схема последовательно реализуемых стадий превращения исходного сырья в лекарственное средство. Требования к биообъектам микроуровня.
  18. Подготовительные операции при использовании биообъектов микроуровня. Многоэтапность подготовки посевного материала, инокуляторы.
  19. Кинетические кривые роста микроорганизмов в закрытых системах. Связь скорости изменения количества микроорганизмов в экспоненциальной фазе роста с концентрацией субстрата в системе.
  20. Питательные среды, их классификация, особенности рецептуры (составов) в зависимости от цели использования и вида биообъекта. Уравнение Моно.
  21. Методы стерилизации питательных сред, критерий Дейндорфера – Хэмфри. Установка для непрерывной стерилизации.
  22. Очистка и стерилизация технологического воздуха, схема подготовки газового потока, подаваемого в ферментер. Коэффициент проскока.
  23. Стерилизация ферментационного оборудования. "Слабые точки" внутри стерилизуемых емкостей, проблемы герметизации оборудования и коммуникаций.
  24. Выделение, концентрирование и очистка как стадии в производстве биотехнологических продуктов, специфические особенности.
  25. Седиментация биомассы. Уравнение скорости осаждения. Факторы, влияющие на скорость седиментации: коагулянты, флокулянты и др.

26. Центрифугирование. Как метод выделения из культуральной жидкости клеток высших растений, микроорганизмов. Отделение целевых продуктов, превращенных в твердую фазу. Сепарирование эмульсий.
27. Фильтрация в биотехнологическом производстве. Факторы, влияющие на процесс фильтрации. Предварительная обработка культуральной жидкости для более полного разделения фаз: кислотная коагуляция, тепловая коагуляция, внесение электролитов.
28. Методы извлечения внутриклеточных продуктов. Методы разрушения клеточной стенки биообъектов, экстрагирование целевых продуктов.
29. Мембранная технология, методы мембранного разделения в очистке биотехнологических продуктов. Классификация методов, их характеристика.
30. Сушка биотехнологических продуктов. Методы сушки их характеристика.
31. Стандартизация лекарственных средств, получаемых методами биотехнологии. Фасовка.
32. Основные параметры контроля и управления биотехнологическими процессами: контроль состава технологических растворов и газов; контроль концентрации субстратов и биотехнологических продуктов (потенциметрические методы контроля pH и ионного состава; датчики pH и ионоселективные электроды, титриметрические методы, оптические методы, биохимические (ферментативные) методы контроля).
33. Селекция как один из методов получения более продуктивных биообъектов и биообъектов с другими качествами. Вариационные ряды.
34. Мутагенез. Физические, химические, биологические мутагены, механизм их действия. Классификация мутаций. Проблема генетической стабильности мутантов по признаку образования целевого биотехнологического продукта.
35. Клеточная инженерия. Использование ее методов в создании микроорганизмов и клеток растений – новых продуцентов БАВ. Метод слияния протопластов применительно к растительным клеткам.
36. Методы клеточной инженерии применительно к животным клеткам. Понятие гибридомы.
37. Генетическая инженерия и создание с помощью ее методов продуцентов новых лекарственных веществ. Плазмиды. Их функции, основные физико-химические характеристики, взаимодействие плазмид с геномом хозяина.
38. Роль плазмидной и фаговой ДНК в генетическом конструировании продуцентов биологически активных веществ. Понятие вектора в генетической инженерии, векторные молекулы на основе плазмидной и фаговой ДНК.
39. Основные принципы технологии рекомбинантной ДНК. Ферменты, используемые в генетической инженерии: рестриктазы, лигазы и механизм их действия.
40. Генетические маркеры.
41. Геномика. Полное секвенирование генома. Значение международного проекта «Геном человека» в медико-биологическом аспекте.
42. Протеомика. Значение для производства лекарственных и диагностических средств.
43. Инженерная энзимология. Цели, задачи.
44. Имобилизация индивидуальных ферментов, ферментных комплексов и клеток продуцентов, ее значение.
45. Носители, применяемые для имобилизации биообъектов.
46. Методы имобилизации ферментов (перечислить) и их характеристика. Физическая имобилизация: адсорбция, преимущества и недостатки.
47. Имобилизация биообъектов путем включения в структуру геля.
48. Имобилизация путем микрокапсулирования, включения биообъекта в волокна, в липосомы.
49. Ковалентная (химическая) имобилизация, имобилизация путем поперечных сшивок. Механизм предварительной активации носителя, бифункциональные реагенты.

50. Использование иммобилизованных ферментов в разделении рацематов аминокислот, в лечебном питании (иммобилизованная бета-галактозидаза, иммобилизованная глюкоизомераза).
51. Иммобилизация целых клеток микроорганизмов и растений.
52. Использование иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических бета-лактамовых антибиотиков, трансформации стероидов, биокаталитическом получении простаноидов.
53. Создание биокатализаторов второго поколения на основе одновременной иммобилизации продуцентов и фермента трансформации продукта биосинтеза. «Открытые системы для усложнения».
54. Ферментные электроды на основе иммобилизованных ферментов. Биосенсоры.
55. Иммобилизация лекарственных средств и ее особенности. Ассортимент применяемых в медицине иммобилизованных препаратов.
56. Первичные и вторичные метаболиты как целевые биотехнологические продукты. Трофо- и идеофазы роста биообъектов-продуцентов. Значение для повышения эффективности работы ферментеров.
57. Механизмы внутриклеточной регуляции и биосинтез целевых биотехнологических продуктов: индукция и репрессия синтеза ферментов; состав оперона. Механизмы регуляции действия генов и их использование в биотехнологических процессах.
58. Механизм ретроингибирования. Аллостерическая регуляция активности ферментов. Аллостерические ферменты. Создание мутантов с нарушением аллостерического центра, оптимизация подбора сред.
59. Аминокислотный контроль метаболизма и функции гуанозинтетрафосфата. Позитивный и негативный контроль.
60. Регуляция усвоения азотсодержащих соединений. Понятие кумулятивного ретроингибирования. Мутанты с измененной регуляцией азотного метаболизма и возможности интенсификации биосинтеза ряда первичных, вторичных метаболитов и некоторых ферментов.
61. Катаболитная репрессия: "глюкозный эффект" и подавление синтеза катаболических ферментов. Транзистентная репрессия. Исключение индуктора. Катаболитное ингибирование.
62. Внутриклеточный транспорт и секреция биотехнологических продуктов у микроорганизмов: структура и видовая специфичность оболочки. Классификация систем транспорта, регуляция их функций. Механизмы секреции высокомолекулярных биотехнологических продуктов.
63. Суперпродуценты. Сохранение свойств промышленных штаммов микроорганизмов - продуцентов лекарственных веществ.
64. Антибиотики как биотехнологические продукты. Биологическая роль антибиотиков как вторичных метаболитов.
65. Продуценты антибиотиков, их характеристика. Особенности строения клеток и цикла развития при ферментации.
66. Методы скрининга продуцентов антибиотиков.
67. Пути создания высокоактивных продуцентов антибиотиков.
68. Методы сохранения штаммов суперпродуцентов антибиотиков.
69. Механизмы защиты суперпродуцентов от собственных антибиотиков.
70. Биосинтез антибиотиков: мультиферментные комплексы, сборка углеродного скелета молекул антибиотиков бета-лактамов.
71. Биосинтез антибиотиков: аминогликозидов, тетрациклинов, макролидов.
72. Общие закономерности ферментационного процесса биосинтеза антибиотиков.
73. Факторы, влияющие на интенсивность биосинтеза антибиотиков.
74. Технология биосинтеза антибиотиков: типы ферментаций, технологическая схема процесса производства.

75. Выделение и очистка антибиотиков (примеры использования процессов экстракции, сорбции, мембранных технологий).
76. Сушка препаратов антибиотиков, используемая аппаратура.
77. Стандартизация и контроль качества лекарственных препаратов антибиотиков.
78. Экологические аспекты организации биотехнологического производства антибиотиков.
79. Механизмы действия антибиотиков (ингибиторы образования клеточной стенки бактерий; ингибиторы белкового синтеза у бактерий; ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот; ингибиторы функций цитоплазматической мембраны микробной клетки).
80. Механизмы резистентности бактерий к антибиотикам.
81. Пути преодоления антибиотикорезистентности. Новые поколения цефалоспоринов, пенициллинов, эффективных в отношении резистентных микроорганизмов; карбапенемы; монобактамы; комбинированные препараты: амоксиклав, уназин.
82. Полусинтетические антибиотики. Использование методов оргсинтеза, биосинтеза в создании новых высокоэффективных антибиотиков.
83. Достоинства биотехнологии в получении биологически активных веществ на основе культур клеток и тканей растений. Области использования культур клеток растений. Условия перехода на получение лекарственных препаратов на основе клеток растений.
84. Понятие культуры клеток и тканей растений. Каллусные и суспензионные культуры, их характеристика. Тотипотентность растительных клеток.
85. Основные разделы (этапы) при получении биологически активных веществ из культуры растительных клеток. Общая схема получения продуктов вторичного метаболизма из культуры растительной ткани.
86. Подбор ингредиентов среды культивирования для обеспечения роста и синтеза продуктов вторичного метаболизма. Примеры составов питательных сред, применяемых при культивировании клеток и тканей растений.
87. Фитогормоны, как регуляторы роста растительных клеток в культурах (примеры).
88. Другие факторы (температура, освещенность, условия аэрации и др.), влияющие на синтез и степень накопления вторичных метаболитов.
89. Получение каллусных культур. Проблема стерильности экспланта. Кривая роста каллусной ткани.
90. Каллусное и суспензионное культивирование клеток растений, подход к их выбору, достоинства, недостатки.
91. Биореакторы для культивирования клеток растений, обеспечение стерильности.
92. Особенности культивирования клеток растений по сравнению с микробиологическим синтезом.
93. Иммобилизация растительных клеток. Преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с суспензионными культурами. Методы иммобилизации, проблемы экскреции целевого продукта из иммобилизованных клеток.
94. Методы контроля и идентификации биомассы и препаратов, полученных методом клеточной биотехнологии.
95. Применение растительных клеток для трансформации лекарственных веществ; получение дигоксина, ментола. Лекарственные препараты, получаемые из культур клеток женьшеня, родиолы розовой, воробейника, стевии, наперстянки, табака и др.
96. Перспективы производства лекарственных средств на основе культуры растительных клеток и тканей.
97. Ферменты, как биотехнологические продукты, основные направления использования ферментов в медицине.
98. Традиционные и микробиологические технологии получения ферментов, источники получения, исходный материал.
99. Технологическая схема получения ферментов микробиологическим синтезом.
100. Особенности культивирования микроорганизмов продуцентов ферментов.

101. Условия успешного выделения ферментов как целевых продуктов.
102. Современные методы выделения ферментов.
103. Основные направления использования ферментов как лекарственных средств. Лекарственные препараты ферментов, их лекарственные формы.
104. Биологическая роль витаминов. Методы получения витаминов.
105. Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин), основные продуценты, схема биосинтеза и пути интенсификации процесса.
106. Микроорганизмы прокариоты – продуценты витамина В<sub>12</sub> и (пропионовокислые бактерии и др.): схема биосинтеза, регуляция биосинтеза.
107. Микробиологический синтез пантотеновой кислоты.
108. Микробиологический синтез витамина РР.
109. Биотехнологическое производство аскорбиновой кислоты (витамина С): микроорганизмы-продуценты, различные схемы биосинтеза в промышленных условиях; химический синтез аскорбиновой кислоты и стадия биоконверсии в производстве витамина С.
110. Эргостерин и витамины группы D: продуценты и схема биосинтеза эргостерина; среды и пути интенсификации биосинтеза, получение витамина D из эргостерина.
111. Каротиноиды и их классификация, схема биосинтеза, среды для микроорганизмов-продуцентов и регуляция биосинтеза, стимуляторы каротинообразования, β-каротин. Образование из β-каротина витамина А;
112. Убихиноны (коферменты Q): источник получения: дрожжи и др. интенсификация биосинтеза.
113. Характеристика аминокислот как биотехнологических продуктов. Классификация, функциональное значение, применение аминокислот как лекарственных средств.
114. Методы получения аминокислот, преимущества и недостатки.
115. Общая технологическая схема микробиологического синтеза аминокислот.
116. Основные пути регуляции биосинтеза аминокислот. Цель биотехнолога в получении аминокислот, как первичных метаболитов.
117. Общие принципы конструирования штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот. Ауксотрофные мутанты.
118. Методы получения глутаминовой кислоты. Механизм биосинтеза глутаминовой кислоты.
119. Механизмы биосинтеза лизина, подход к регуляции процесса.
120. Механизмы биосинтеза треонина, подход к регуляции процесса.
121. Химико - энзиматический синтез аминокислот (примеры). Использование иммобилизованных клеток и ферментов.
122. Получение оптических изомеров аминокислот путем использования ацилаз микроорганизмов.
123. Стероидные гормоны, как биотехнологические продукты. Структура важнейших стероидных гормонов. Источники получения.
124. Традиционные источники получения, исходное сырье, используемое при синтезе стероидных препаратов.
125. Преимущества биотрансформации стероидов перед химической модификацией. Общие черты микробиологической трансформации стероидных структур.
126. Штаммы микроорганизмов, обладающие способностью к трансформации (биоконверсии) стероидов. Основные процессы микробиологической трансформации.
127. Конкретные реакции биоконверсии стероидов. Микробиологический синтез гидрокортизона, получение из него путем биоконверсии преднизолон, значение иммобилизации микроорганизма-трансформатора.
128. Рекомбинантные белки (рес-белки), принадлежащие к различным группам физиологически активных веществ. Основные продуценты рес-белков.
129. Этапы создания рекомбинантной ДНК.

130. Инсулин. Биологическая роль, строение; видовая специфичность. Источники и способы получения (перечислить). Преимущества *E.Coli* в качестве промышленного штамма продуцента инсулина.
131. Рекомбинантный инсулин человека. Способ получения через проинсулин.
132. Рекомбинантный инсулин человека. Способ получения через отдельный биосинтез А- и В-цепей. Преимущества метода.
133. Стандартизация препаратов инсулина.
134. Гормон роста человека. Биологическая роль, строение. Проблемы производства из животного сырья.
135. Конструирование рекомбинантной ДНК соматотропина, микробиологический синтез.
136. Особенность очистки гес-соматотропина, условия производства лекарственных средств и формы выпуска препаратов гормона роста человека.
137. Эритропоэтин. Биологическая роль, строение, источники и способы получения.
138. Технология получения рекомбинантного эритропоэтина.
139. Лекарственные формы препаратов эритропоэтина. Стандартизация.
140. Иммуобиотехнология как один из разделов биотехнологии. Основные составляющие и пути функционирования иммунной системы.
141. Усиление иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов, их классификация. Иммуносупрессоры.
142. Вакцины. Определение, классификации.
143. Состав вакцин, функции компонентов, примеры.
144. Традиционные методы получения вакцин, генно-инженерные живые вакцины. Сравнительная характеристика. Стандартизация.
145. Сыворотки. Определение, методы получения. Стандартизация.
146. Бактериофаги. Определение, методы получения. Ассортимент.
147. Интерлейкины: механизм биологической активности; перспективы практического применения.
148. Микробиологический синтез интерлейкинов. Получение продуцентов методами генетической инженерии. Перспективы биотехнологического производства.
149. Интерфероны. Классификация. Видоспецифичность интерферонов.
150. Методы получения интерферонов и их ограничения. Индукторы интерферонов: их природа; механизм индукции.
151. Промышленное производство интерферонов на основе природных источников. Синтез различных классов интерферона человека в генетически сконструированных клетках микроорганизмов. Проблемы стандартизации.
152. Понятие о моноклональных антителах (МАТ). Сравнительная характеристика поликлональных и моноклональных антител. Методы получения и требования к ним.
153. Этапы гибридной технологии.
154. Гибридомы. Способы увеличения частоты их образования. Криоконсервирование; банки гибридом. Гибридные гибридомы (фузомеры) и создание искусственных антител, абизимов. Перспективы их применения в медицине.
155. Области применения моноклональных антител.
156. Иммуоферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА).
157. «Сендвич»-технологии для экспресс-диагностики заболеваний. Использование коммерческих тест-систем в медицинской диагностике, терапии и профилактике.
158. Общие проблемы микробиологии человека: понятие симбиоза; различные виды симбиоза; резидентная микрофлора желудочно-кишечного тракта. Функции симбиотной микрофлоры.
159. Механизмы антагонистического воздействия бифидо- и молочнокислых бактерий на условно-патогенную микрофлору. Дисбактериоз, причины возникновения.
160. Производство препаратов пробиотиков. Требования к штаммам микроорганизмов симбионтов.

161. Общая схема технологического процесса производства пробиотиков.
162. Монопрепараты и препараты на основе смешанных культур; лекарственные формы бифидумбактерина, колибактерина, лактобактерина.
163. Ассортимент импортных и отечественных лекарственных средств пробиотиков на отечественном рынке.
164. Единая система GLP, GCP и GMP при доклинических, клинических исследованиях и производстве биологических лекарственных препаратов.
165. Требования Правил надлежащей производственной практики (GMP) к биотехнологическому производству.
166. Современное состояние методов и средств автоматического контроля в биотехнологии.
167. Организация контроля охраны окружающей среды в условиях биотехнологического производства. Классификация отходов.
168. Очистка жидких отходов, схемы очистки; активный ил и входящие в него микроорганизмы.
169. Уничтожение или утилизация твердых (мицелиальных) отходов: биологические, физико-химические, термические методы обезвреживания. Очистка выбросов в атмосферу.
170. Перспективы развития биотехнологии в мире и в РФ.

**2) Типовые задания для оценивания результатов сформированности компетенции на уровне «Уметь» (решать типичные задачи на основе воспроизведения стандартных алгоритмов решения):**

1. Обмениваться информацией и профессиональными знаниями устно и письменно.
2. Табулировать экспериментальные данные, графически представлять их, проводить математические расчеты.
3. Самостоятельно осуществляет поиск, сбор, хранение, преобразование и распространения информации с применением информационных и библиографических ресурсов при организации и проведении биотехнологического процесса.
4. Применять биотехнологическую терминологию для решения профессиональной задачи.
5. Использовать приборы, указанные в описании практической работы.
6. Выделять чистую культуру микроорганизма (делать посевы, идентифицировать чистую культуру);
7. Выбирать оптимальный вариант технологии и изготавливать лекарственные формы;
8. Выбирать упаковочный материал и осуществлять маркировку лекарственной формы в зависимости от ее вида, пути введения и физико-химических свойств лекарственных и вспомогательных веществ;
9. Оценивать технические характеристики фармацевтического оборудования и машин;
10. Получать готовые лекарственные формы на лабораторно-промышленном оборудовании.
11. Владеть методикой измерения значений физических величин;
12. Владеть техникой создания необходимого санитарного режима аптеки и фармацевтических предприятий
13. Владеть методиками постадийного контроля качества при производстве и изготовлении лекарственных средств.
14. Уметь обеспечивать условия асептического проведения биотехнологического процесса и его соответствие современным требованиям к организации производства;

15. Учитывать влияние биотехнологических факторов на эффективность технологического процесса и поддерживать оптимальные условия для биосинтеза целевого продукта.
16. Использовать математические методы для создания оптимальных технологических параметров, параметров ферментации и их корректирования;
17. Обеспечивать асептическое проведение биотехнологического процесса.
18. Осуществлять подбор питательной среды и условий культивирования.
19. Проводить иммобилизацию биообъекта.
20. Уметь работать с оборудованием: центрифугой, фильтровальной установкой и др. с соблюдением техники безопасности.

### **Ситуационные задачи (СЗ):**

**СЗ 1.** При использовании клеточной инженерии для создания новых продуцентов широко применяют методику протопластирования как процесс конструирования гибридных структур.

*В условиях поставленной задачи предложите:*

- технологическую схему этапов получения протопластов
- методы клеточной инженерии применительно к животным клеткам

**Эталон ответа.** Техника протопластирования включает следующие этапы:

- выбор биообъектов (прокариот, эукариот);
- обработку клеточных стенок ферментами;
- стабилизацию протопластов (10% гипертонический раствор маннита, сахарозы, хлорида натрия)
- слияние протопластов в среде полиэтиленгликоля (ПЭГ) (в результате фузии получается протопласт с диплоидным набором хромосом и происходит рекомбинация ДНК)
- регенерация (восстановление стенки протопласта)

Примером клеточной инженерии применительно к животным клеткам является гибридная технология, основанная на слиянии антителообразующих клеток (лимфоцитов) и опухолевых клеток (способных к неограниченному росту) с образованием гибридом, способных к продукции антител определенной специфичности (МАТ).

**СЗ 2:** Убихиноны (коферменты Q) – регуляторы тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования и др., в последнее время вызывают интерес в качестве перспективных общеукрепляющих, антиоксидантных, иммуностимулирующих лекарственных препаратов.

*В условиях поставленной задачи предложите:*

- источники получения КоQ<sub>9</sub> и КоQ<sub>10</sub>;
- варианты технологии интенсификации биосинтеза.

**Эталон ответа.** В производстве убихинонов применяют биотехнологические методы в основе которых лежит экстракция КоQ из биологического материала. В качестве субстрата используются как растительные ткани (каллус риса или опухолевые ткани *Carthamus tinctorius*), так и микроорганизмы, например, дрожжи *Cryptococcus curvatus* и грибы *Candida maltosa*.

**КоQ<sub>9</sub>** Получают из микробных липидов, являющихся побочным продуктом крупного производства белково-витаминного концентрата при выращивании грибов *Candida maltosa*.

**КоQ<sub>10</sub>** При производстве аскорбиновой кислоты на этапе окисления d-сорбита в L-сорбозу используется биомасса уксуснокислых бактерий (*Gluconobacter oxydans*), которая содержит значительное количество КоQ<sub>10</sub> без примеси его гомологов. Разработана и внедрена совместная технология получения L-сорбозы и экстракции КоQ<sub>10</sub> из отсепарированной биомассы с последующей очисткой (выход ГП до 85%).



**СЗ 3:** Востребованность препаратов на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов (нормофлоры, пробиотики) для лечения и профилактики дисбактериозов не вызывает сомнений. Эта продукция относится к чисто биотехнологическому производству.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- требования к штаммам микроорганизмов симбионтов, служащих в условиях промышленного производства основой для получения пробиотиков;
- особенности ферментации (режим, продолжительность, оптимальные фазы роста)

**Эталон ответа.** Пробиотики — живые микроорганизмы и/или вещества микробного либо иного происхождения, оказывающие благоприятные эффекты как на физиологические функции, так и на биохимические и поведенческие реакции организма хозяина, оптимизируя его микробиологический статус. Штаммы микроорганизмов-симбионтов выделяют из кишечного содержимого здоровых детей и взрослых и идентифицируют. Требования к штаммам: высокая антагонистическая активность к условно-патогенной микрофлоре, способность прикрепляться к эпителию кишечника, не гидролизовать кишечную слизь, не повреждать клетки кишечного эпителия, технологичность (т.е. хорошо расти и размножаться на искусственных питательных средах), криорезистентность. Штаммы проверяют на патогенность и токсичность *in vitro*.

В условиях промышленного производства штаммы рассеивают и получают отдельные колонии, которые пересевают на агаризованные или жидкие питательные среды. В процессе ферментации (несколько часов) получают бактериальную суспензию, добавляют раствор криопротекторов (молоко, желатин, лактоза, сахароза) и разливают в ампулы. Далее следует заморозка в жидком азоте и лиофильная сушка. Режим ферментации периодический. Собирают штаммы в той фазе роста, при которой выживание клеток культуры является наиболее стабильным, как правило, это конец экспоненциальной фазы и начало стационарной.

**СЗ 4:** Глубинная аэробная ферментация создала возможность современному биотехнологическому производству выпускать антибиотики в большом количестве. Для высокопродуктивной ферментации необходимо соблюдать определенные условия. Учитывать влияние компонентов питательной среды, в частности, источников углерода, азота, фосфора и др. на рост биомассы и активность биосинтеза антибиотика.

*Основываясь на общих закономерностях ферментационного процесса биосинтеза антибиотиков, предложите:*

- оптимизацию условий ферментации для получения максимального количества целевого продукта.

**Эталон ответа.** Продуценты антибиотиков – аэробы, реже факультативные анаэробы, следовательно, ферментер должен быть снабжен аэратором. Продуценты выращиваются чаще всего на комплексных питательных средах, содержащих источники углерода, азота, фосфора (соевая, хлопковая мука, кукурузный экстракт, органические соединения, минеральные соли). Подбор ПС индивидуален для каждого продуцента. Должна быть определенная концентрация элементов, а также их определенное соотношение: углерод-азот; азот-фосфор и т.д. В ферментационном процессе выделяют 2 фазы: трофофазу (сбалансированного роста) и идиофазу (несбалансированного роста). В трофофазе накапливается биомасса за счет быстрой утилизации источников углерода, азота, антибиотик не обнаруживается. Далее в идиофазу количество источников углерода и азота в среде уменьшается, прирост биомассы замедляется, наступает накопление антибиотика. Углеродкатаболитная регуляция – быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков, следовательно, необходим переход на трудноусвояемые источники углерода (крахмал). Легкоутилизуемые источники азота – усиливают рост продуцента,

но снижают активность накопления антибиотика, следовательно, переход на трудноусваиваемые источники азота (соевая, хлопковая мука). Высокое содержание в ПС фосфора приводит к обогащению клеток АТФ, что повышает скорость роста мицелия, следовательно, оптимизация его количества.

**СЗ 5:** В настоящее время кальциферол производят из эргостерина с применением УФ-облучения биотехнологическим методом.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- продуценты и промышленные источники эргостерина;
- схему биосинтеза витамина D из эргостерина.

**Эталон ответа.** В качестве промышленного источника эргостерина используются дрожжи *Saccaromyces cerevisiae* вследствие высокого содержания в них эргостерина (D<sub>1</sub>). Источником эргостерина могут быть дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

*Схема биосинтеза витамина D<sub>2</sub> из эргостерина.*

**Исходная культура:** *Saccaromyces cerevisiae*

**ПС:** избыток углерода (C), малое количество азота (N), концентрация O<sub>2</sub> (0,03 до 2%) - индукция синтеза.

**Условия культивирования:** аэробные (в анаэробных условиях накапливается предшественник эргостерина – сквален)

Время ферментации 12-20 ч.

**Накопление целевого продукта происходит в биомассе**, к которой добавляют антиоксидант и сушат (содержание эргостерина 1,5%). Подвергают УФ-облучению в биомассе накапливается эргокальциферол (D<sub>2</sub>). Биомасса уже может использоваться как пищевая добавка, содержащая D<sub>2</sub>.

Для получения кристаллической формы D<sub>2</sub> проводят гидролиз раствором HCl при t=110°. К гидролизату добавляют этанол при t=75°, охлаждают, фильтруют. Массу после фильтрования промывают, сушат. Далее проводят спиртовую экстракцию 3-х кратным объемом этанола при t=110°. Спиртовой экстракт сгущают, получают липидный концентрат, который омыляют раствором NaOH. Из неомыленной фракции кристаллизуют эргостерин при t=0°. Проводят сушку очищенного и повторно перекристаллизованного эргостерина, растворение в эфире, УФ-облучение, отгонка эфира, кристаллизация витамина D<sub>2</sub>.

**СЗ 6:** В настоящее время в фармацевтической промышленности широко используются промышленные биокатализаторы – иммобилизованные ферменты. Иммобилизация ферментов существенно повышает их стабильность, позволяет длительно использовать одну серию промышленного биокатализатора в технологическом процессе.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- использование иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических бета-лактамовых антибиотиков; трансформации стероидов; разделении рацематов аминокислот.

**Эталон ответа.** Иммобилизованная **пенициллинамидаза** расщепляет бензилпенициллин с образованием 6-АПК по амидной связи с 6-аминогруппой и не затрагивает более лабильную амидную связь β-лактамового кольца. Фермент пенициллинамидаза легко включается в полиакриламидный гель, модифицированный глутаровым альдегидом, и обладает в нем достаточно высокой стабильностью. Пенициллинамидаза позволяет получить многие «полусинтетические» пенициллины.

При использовании иммобилизованной **аминоацилазы** для разделения рацематов аминокислот, **аминоацилаза** гидролизует амидную связь только у L-изомера. Образующаяся свободная L-аминокислота, обладающая большей растворимостью, отделяется от ацилированной D-аминокислоты физическими методами (фильтрованием). Иммобилизацию аминоацилазы проводят адсорбцией на полимерном носителе.

При биотрансформации стероидов из гидрокортизона получают более эффективный препарат преднизолон в результате реакции 1,2 дегидрирования. В реакции участвует внутриклеточный фермент – **3-кето-стероид-1,2-дегидрогеназа**, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны бактерий и актиномицетов, особенно часто это представители родов *Artrobacter*, *Corynebacterium*. Реакцию 1,2 дегидрирования стероидных соединений наиболее часто осуществляют с помощью живых иммобилизованных клеток *Artrobacter globiformis*, включенных в **полиакриламидный гель** с обеспечением поддержания нормального метаболизма клеток.

**СЗ 7:** Аскорбиновая кислота в мировом промышленном производстве витаминной продукции в целом занимает наибольшую долю – около 40 тыс. тонн в год. Широкое использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез витамина С, сокращая многоэтапные и дорогие химические стадии.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- микроорганизмы-продуценты,
- различные схемы биосинтеза в промышленных условиях.

**Эталон ответа.1.** Синтез аскорбиновой кислоты представляет собой многостадийный химический процесс, в котором имеется лишь одна стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу с участием уксуснокислых бактерий (*Gluconobacteroxydans*).

**2.** Синтез витамина С осуществляют енолизацией его важнейшего промежуточного продукта – 2-кето-L-гулоновой кислоты (2-КЛГ), которую в свою очередь, получают методом 2-х стадийного микробиологического синтеза:

А) окисление d-глюкозы в 2,5-дикето-d-глюконовую кислоту (2,5-ДКДГК)

м/о – *Erwinia Punctata*

Б) восстановление 2,5-ДКДГК в (2-КЛГ)

м/о – *Corynebacterium sp.*

Однако, при совместном культивировании продуцентов в одном биореакторе, происходит ингибирование синтеза 2-КЛГ. Поэтому культуральную жидкость после выращивания *Erwinia Punctata* и накопления 2,5-ДКДГК стерилизуют.

**3.** Гулоновая кислота синтезируется штаммами микроорганизмов рода *Gluconobacter* из сорбозы. Способность к синтезу целевого продукта обусловлена наличием у этого м/о специфических дегидрогеназ.

**СЗ 8:**Применяемый в каждом конкретном случае метод выделения целевого продукта определяется его месторасположением (внутри клетки или вне ее), физико-химическими константами (молекулярной массой, растворимостью и др.). Так же определяется начальными свойствами культуральной жидкости (вязкости, наличия примесей и др.), а также требуемой степенью чистоты и конечной формой продукта (кристаллическое вещество, лиофилизированный порошок и т.д.)

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- последовательность операций выделения целевого продукта;
- методы выделения, концентрирования и очистки биотехнологических продуктов.

**Эталон ответа.** Последовательность операций выделения и очистки целевого продукта и используемые методы.

**Отделение нерастворимых веществ.** Для этих целей используют методы: фильтрование, центрифугирование и/или отстаивание, седиментацию и декантацию.

**Первичное выделение** (значительно возрастает концентрация целевого продукта). Методы: экстракция растворителями, сорбция, осаждение, ультрафильтрация.

**Очистка.** Цель – отделение примесей и дальнейшее концентрирование целевого продукта. Методы: фракционное осаждение, различные хроматографические методы, адсорбция, кристаллизация.

**Окончательная очистка продукта (кристаллизация).** Методы: центрифугирование с последующим высушиванием кристаллического вещества, сушка с распылением, лиофильная сушка и др.

**СЗ 9:** Одно из существенных мест на фармацевтическом рынке занимают лекарственные средства стероидных гормонов, обладающие большой широтой спектра и высокой избирательностью физиологического воздействия. С момента установления структуры основных стероидных гормонов в качестве метода получения лекарственных препаратов стали применять биотрансформацию.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- конкретные реакции биоконверсии стероидов
- микробиологический синтез гидрокортизона, получение из него преднизолона путем биоконверсии

**Эталон ответа.** Обширный класс стероидов характеризуется наличием в молекуле – циклопентанпергидрофенантрена. Биологическая активность стероидов связана с биотрансформацией структуры стероидов:

- окисление гидроксила в 3 положении
- отщепление боковых цепей в 17 положении
- введение 1,2- двойной связи (дегидрирование)
- гидроксирование в 11-β положении.

Реакция	Субстрат	Продукт	Микроорганизм-трансформатор
11α-гидроксирование	Прогестерон	11α-гидрокси-прогестерон	Rhizopus nigricans
11 β -гидроксирование	Вещество S	Гидрокортизон	Curvularia lunata
1,2-дегидрирование	Гидрокортизон	Преднизолон	Artrobacter simplex
Расщепление боковой цепи	В-ситостерин	АД или андроста-диендион	Mycobacterium simplex

При биотрансформации стероидов из гидрокортизона получают более эффективный препарат преднизолон в результате реакции 1,2 дегидрирования. В реакции участвует внутриклеточный фермент – **3-кето-стероид-1,2-дегидрогеназа**, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны бактерий и актиномицетов, особенно часто это представители родов Artrobacter, Corynebacterium. Реакцию 1,2 дегидрирования стероидных соединений наиболее часто осуществляют с помощью живых иммобилизованных клеток Artrobacter globiformis, включенных в **полиакриламидный гель** с обеспечением поддержания нормального метаболизма клеток.

**СЗ 10:** В клинической практике используется рекомбинантный белок, полученный методом микробиологического синтеза, – гормон роста человека, который секретируется передней долей гипофиза. Биологическая активность выделенного белка идентична образцу, полученному из гипофиза.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- механизм биологической активности и перспективы применения в медицинской практике
- конструирование продуцентов и микробиологический синтез.

**Эталон ответа.** В начале 1960 г. природный ГРЧ был применен для лечения карликовости у детей. Клонирование гена ГРЧ и получение рекомбинантного гормона привело к резкому расширению его применения в медицине. Аминокислотная последовательность установлена в 1964 г. ГРЧ представляет собой белок, состоящий из

191 аминокислотного остатка и имеющий 2 дисульфидные связи (между 35-165 и 182-189 остатками) и 4 основных альфа-спирали. Химический синтез столь длинного полипептида экономически не целесообразен.

Первый фармацевтический препарат рекомбинантного ГРЧ – соматрем (соматонорм) был получен в системе цитоплазматической экспрессии гена ГРЧ в *E. Coli*. На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получали последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 АМК-т. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-ой до 23-ей. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстраивали» к паре промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона – 2,4 мг на 1 мл культуры *E. Coli*.

**С3 11:** Изолированные ткани и клетки растений могут успешно культивироваться в биореакторе, при условии создания для них системы жизнеобеспечения и постоянного контроля активности роста и деления клеток, контроля образования БАВ.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- применение растительных клеток для трансформации лекарственных веществ (получение дигоксина, ментола)
- методы контроля, идентификации биомассы и препаратов, полученных методом клеточной биотехнологии.

**Эталон ответа.** Биотрансформация — метод, использующий ферменты, локализованные в клетках растения, которые обладают способностью изменять функциональные группы химический соединений добавляемых извне. Биотрансформация дигитоксина в дигитоксин осуществляется за счет реакции 1, 2-гидроксилирования, катализируемая ферментом, находящимся в недифференцированной культуре клеток (суспензии) растения *Digitalis Lanata*. Сами по себе ККР не образуют сердечных гликозидов, но успешно осуществляют реакции биотрансформации субстратов, добавляемых в питательную среду. Перевод пулегона и ментона в ментол происходит в присутствии суспензии клеток мяты перечной.

**Методы контроля, идентификации биомассы:**

1. Визуальная оценка внешних признаков (цвет, форма и т.д.).
2. Подсчет клеток с определением линейных размеров или числа жизнеспособных клеток (метод окрашивания, микроскопирование).
3. Определение количества клеток в биомассе по объему осаждения в центрифужных пробирках.
4. Определение биомассы по интенсивности дыхания (изменение концентрации CO<sub>2</sub> инфракрасным газоанализатором)
5. Использование физико-химических методов: кондуктометрически, спектрофотометрически, колориметрически и др.
6. Определение содержания спирта 96% или сулемы 0,1% (используемых для стерилизации растительного экспланта)

**Методы контроля лекарственных препаратов** (проводят в соответствии с НД) и определяют: содержание БАВ; определение биологической активности (СГ и др.); определение содержания предшественников, элиситоров; микробиологическая чистота.

**С3 12:** В медицинской практике в качестве противовоспалительных, анаболических, контрацептивных и других ЛС применяют стероидные гормональные препараты – кортикостероиды, гестагены, эстрогены и андрогены. Для синтеза стероидных гормонов используют природные соединения, ядром молекулы которых является циклопентанпергидрофенантрен. Проведение различных модификаций этой структуры дает возможность получать ценные ЛС.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- традиционные источники получения;

- преимущества биотрансформации перед химической трансформацией;
- штаммы микроорганизмов, обладающие способностью к трансформации (биоконверсии) стероидов.

**Эталон ответа.** Источники получения:

1. Саласодин (из паслена дольчатого) низкий выход;
2. Диосгенин (из диоскорей дельтовидной) импортное сырье;
3. Ситостерин – основной источник, находится во всех растениях, может быть выделен из отходов переработки древесины.

Общей чертой всех процессов микробиологической трансформации является изменение молекулярной структуры трансформируемого вещества, а не синтез молекулы *de novo*. Реакции биотрансформации строго специфические, осуществляются индуцибельными ферментами в строго определенном порядке. Специфическая особенность биотрансформации – использование чистых культур м/о.

Наиболее известны 11 $\alpha$ -гидроксимирующие культуры относятся к родам *Absidia*, *Curvularia* и др. Для дегидрирования в положении 1,2 в основном применяют *Corynebacterium simplex*. Для изомеризации с одновременным окислением 3-оксигруппы в 3-кетогруппу широко используются штаммы *Corynebacterium mediolanum* (sin. *Flavobacterium dehydrogenans*).

**СЗ 13:** В настоящее время производство витамина В<sub>12</sub> осуществляется чисто биотехнологическими методами. Продуцент выращивается на богатой питательной среде в определенных условиях ферментации с обязательным добавлением предшественника витамина В<sub>12</sub>.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- продуценты витамина В<sub>12</sub>
- оптимальный метод ферментации, условия ее проведения;
- предшественник и время его добавления в среду культивирования

**Эталон ответа.** Продуцентом витамина В<sub>12</sub> являются пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*. Выращивание продуцента производят периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. В процессе жизнедеятельности бактерий образуются кислоты, которые нейтрализуют щелочью. Через 72 ч после начала ферментации вносят предшественник — 5,6-диметилбензимидазол. Длительность ферментации составляет около 3 суток. Если не добавить 5,6-ДМБ, то вместо витамина В<sub>12</sub> синтезируется фактор В (кобинамид) не обладающий терапевтическим действием псевдовитамин В<sub>12</sub>, у которого азотистым основанием служит аденин.

**СЗ 14:** К группе иммунобиологических лекарственных препаратов относятся сыворотки. Они используются для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, в случае отравления ядами микробов или животных, при укусах змей, для диагностических целей. Сыворотки получают путем иммунизации домашних животных, а также из культивируемых на искусственных питательных средах животных клеток.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- значение сывороток в создании иммунитета, ассортимент;
- показатель, по которому необходимо постоянно контролировать кровь иммунизированных животных, этапы технологии получения сывороток.

**Эталон ответа.** Сыворотки относятся к иммунобиологическим препаратам для создания пассивного иммунитета, они содержат поликлональные антитела против инфекционных агентов и микробных токсинов. При введении сыворотки больному его организм получает уже готовые антитела.

Ассортимент, примеры: *Сыворотка противостолбнячная 3000 МЕ/амп*, *Сыворотка противоботулиническая тип А, 10000 МЕ/амп*, *Сыворотка против яда гадюки обыкновенной*, *Сыворотка противогангренозная поливалентная* и др.

Для массового производства сывороток проводят иммунизацию домашних животных (ослов, лошадей). Забор крови у животных производят в период максимального содержания антител, для этого необходимо постоянно контролировать кровь по такому показателю, как титр антител у животных. Этапы технологии получения сывороток: вначале выделяют плазму крови, потом удаляют из нее фибрин, получают сыворотку. Недостаток метода: относительно низкая активность сыворотки, существенное количество примесей.

При получении сыворотки из культивируемых животных клеток, главной проблемой является обеспечение стабильного роста животных клеток вследствие их генетической нестабильности, непостоянства генетических экспрессий и старения. В качестве материала для культивирования можно использовать почки обезьян, собак, кроликов, куриный эмбрион (14 дней). Питательные среды должны содержать аминокислоты, белки, липиды, углеводы, витамины, глюкозу, предшественники простагландинов, неорганические соли, микроэлементы, индукторы митотического цикла. Температура культивирования составляет +37 °С.

Консервируют посевной материал клеток (резервный фонд популяции) в жидком азоте при температуре —196 °С в ампулах объемом 1 мл. Процесс замораживания может иметь негативные последствия: образование кристаллического льда в клетке, обезвоживание, повышение концентрации растворенных веществ, поэтому замораживание животных клеток осуществляют в малых объемах (1 мл) с использованием криопротекторов, а скорость замораживания/размораживания колеблется в строго определенных пределах.

**СЗ 15:** Один из возможных способов получения генно-инженерного инсулина основан на раздельном биосинтезе двух цепей.

*В условиях поставленной задачи приведите:*

- схему получения рекомбинантного инсулина по данной технологии.
- параметры стандартизации

**Эталон ответа.** Схема получения рекомбинантного инсулина по «EliLilly» (США)

- Химический синтез генов, кодирующих образование цепей А и В| в определенной последовательности нуклеотидов.
- Конструирование вектора. Введение каждого синтетического гена в плазмиду: в одну — ген, синтезирующий цепь А, в другую — ген, синтезирующий цепь В. Для интенсивной репликации плазмид в каждую из них вводят также ген, кодирующий образование ферментата β-галактозидазы.
- Введение полученных плазмид в клетку *Escherichiacolic* последующим получением двух культур продуцента, одна из которых синтезирует цепь А, а другая цепь В.
- Культуры помещают в ферментер, в культуральную среду добавляют галактозу, которая индуцирует образование фермента β-галактозидазы. При этом плазмиды активно реплицируются и в результате получается большое количество генов, синтезирующих цепи, А и В.
- Клетки лизируют, выделяют цепи А и В, которые обрабатывают бромцианом для отщепления от них β-галактозидазы.
- Затем следует очистка и выделение А и В-цепей.

Далее окисляют остатки цистеина и соединяют цепи А и В.

**Стандартизация:**

Описание – мелкокристаллич. порошок белого цвета

Растворимость – практ. н.р. в воде

Подлинность: метод ВЭЖХ; гипогликемическое действие; аминокислотный анализ, метод пептидного картирования

Проинсулин-подобная иммунореактивность, ppm (д.б. не более 10)

Аминокислотный состав (содержание L-аминокислот, в молях на сухое вещество) по 16 аминокислотам

A21-дезаминоинсулин человека, % (не более 1,0)

Другие родственные соединения, % (не более 1,5)

Примеси с молекулярной массой, превышающие массу инсулина, % (не более 0,5)

Бактериальные эндотоксины.

Количественное определение, Ед/мг:

1. ВЭЖХ не менее 26;

2. Биологический метод не менее 27.5 на сухое вещество.

**С3 16:** Современными методами тонкого органического синтеза можно синтезировать D- и L-формы аминокислот в любых количествах, но все существующие способы их производства приводят к образованию рацематов. Получение 100% биологически активной L-формы аминокислот методом органического синтеза — процесс очень сложный и экономически оправдан лишь в редких случаях. Альтернативой химическому синтезу служит микробиологический процесс.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- преимущества микробиологического синтеза аминокислот перед другими способами получения
- общие принципы конструирования штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот как первичных метаболитов.

**Эталон ответа.** Химический синтез аминокислот невозможен без достаточно большого количества агрессивных и токсичных веществ, что требует проведения дополнительных организационных мероприятий и финансовых затрат для их утилизации. Кроме того, подобные соединения небезопасны для персонала.

#### **Преимущества микробиологического синтеза аминокислот:**

1. Мутантные штаммы-продуценты способны осуществлять сверхсинтез аминокислот уже в L-форме, например, L-лизин, L-глутаминовая кислота, L-триптофан, L-треонин в значительных количествах, что является определяющим фактором при выборе технологии производства аминокислот в промышленном масштабе, т.к. отсутствуют затраты на разделение рацемической смеси.

2. Не используются агрессивные, токсические соединения в качестве исходных веществ, катализаторов.

3. Отсутствие побочных продуктов, следовательно, удешевление очистки целевого продукта.

4. Снижение риска для работы персонала и окружающей среды.

#### **Общие принципы конструирования штаммов:**

В качестве штаммов-продуцентов АМК-т чаще всего применяют: E.Coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum, так как:

- известна полная нуклеотидная последовательность их генома;
- известна регуляция метаболических процессов в клетках;
- они способны синтезировать все 20 АМК-т.

Микроорганизмы осуществляют контроль биосинтеза каждой аминокислоты по принципу обратной связи как на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), так и на уровне самих ферментов, способных при избытке аминокислоты изменять свою активность (ретроингибирование), что совершенно исключает перепроизводство аминокислоты клеткой в природных условиях. Из этого следует, что



целью биотехнолога является нарушение этих систем регуляции с дальнейшим отбором ауксотрофных мутантов на селективных средах.

Промышленный штамм должен обладать способностью к сверхсинтезу нужной аминокислоты. Для этой цели выбирают полиауксотрофные мутанты, т.е. те клетки микроорганизмов, которые, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать необходимые для роста и развития клетки различные аминокислоты, а с другой — приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты.

Такие мутанты получают:

- воздействием мутагенов (УФ, рентгеновские лучи, нитрозосоединения и др.) с последующей селекцией штамма по заданным признакам;
- методами генной инженерии.

**СЗ 17:** Цитокины – продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, осуществляющие короткодистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. К цитокинам относятся интерлейкины, лекарственные препараты которых, применяют для коррекции иммунодефицитных состояний.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- микробиологический синтез интерлейкинов;
- номенклатуру и практическое применение препаратов интерлейкинов.

**Эталон ответа.**

В качестве продуцентов интерлейкинов используют:

1. культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов;
2. клоны трансформированных (опухолевых) клеток;
3. клеточные гибридомы (продукты гибридизации опухолевых лимфоцитов, способных к нормальному росту и Т-клеток, синтезирующих определенный ИЛ;
4. рекомбинантные микробные клетки, полученные методами генной инженерии (E.Coli, пекарские дрожжи).

Продуценты культивируют *in vitro* в сосудах определенного объема, затем ИЛ выделяют из **культуральной жидкости**, концентрируют, очищают. Для увеличения продукции ИЛ культуры клеток стимулируют митогенами (например, фитогемагглютинином и др.)

Для создания рекомбинантных микроорганизмов – продуцентов ИЛ, гены, контролирующие их синтез, вводят в составе вектора в микробную клетку, выделяют и размножают клон рекомбинантов и культивируют полученный продуцент с целью накопления ИЛ.

Используют клетки E.Coli (ИЛ1; ИЛ2), дрожжи-сахаромицеты (ИЛ2), при чем дрожжи более удобны, т.к. E.Coli накапливает целевой белок внутриклеточно, а дрожжи выделяют в культуральную жидкость, следовательно, легкость очистки, что удешевляет продукт.

**Беталейкин** (интерлейкин-1-бета) – рекомбинантный ИЛ-1 $\beta$ , стабилизированный сывороточным альбумином человека (**продуцент –E.Coli**). Выпускается в виде лиофилизированного порошка по 0,05; 0,5; и 1 мг в ампулах для приготовления инфузионного раствора на физ. растворе или 5% растворе глюкозы.

**Ронколейкин** (рекомбинантный ИЛ-2) содержит солубилизатор додецилсульфат натрия и стабилизатор – Д-маннит (**продуцент – пекарские дрожжи**). Применяют при септических состояниях, в качестве противоопухолевого средства при раке почки. Выпускается в виде лиофилизированного порошка в ампулах по 1 мл (1 000 000 МЕ) для инфузий.

**Алдеслейкин** (пролейкин) – лиофилизированный порошок для инфузий, содержащий 1 мг (18 млн ЕД) рекомбинантного ИЛ-2 человека. Рекомбинантная форма отличается от природного интерлейкина (не гликозилирована, т.к. получена от E.Coli), однако в полной мере обладает активностью человеческого ИЛ-2. Активирует клеточный иммунитет. Иммунорегуляторные свойства заключаются в усилении митогенеза лимфоцитов и стимуляции длительного роста интерлейкин-2 зависимых клеточных популяций,

повышении цитотоксичности лимфоцитов, индукции клеток-киллеров, и продукции  $\gamma$ -интерферона, фактора некроза опухоли, ИЛ-1. Противоопухолевое средство.

**С3 18:** При получении аминокислот методами прямого микробиологического синтеза применяют полупериодическую ферментацию (регулируемую) с хорошей аэрацией (барботер) и перемешиванием (мешалка). Используют штаммы суперпродуцентов аминокислот, такие, как *Escherichiacoli*, *Corynebacteriumglutamicum*, *Brevibacteriumflavum*, *Bacillus subtilis*.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- механизмы биосинтеза лизина, треонина: конкретные подходы к регуляции каждого процесса.

**Эталон ответа.** Продуцент лизина — *Corynebacteriumglutamicum* (коринебактерии) — имеет аспартакиназу (фермент), активность которой регулируется путем согласованного ингибирования по принципу обратной связи. Этот мутантный штамм-продуцент является ауксотрофом по гомосерину и треонину. Для длительной работы ауксотрофных штаммов-продуцентов лизина в питательную среду вносят белковые гидролизаты в режиме дробной подачи (комплекс аминокислот).

Для получения L-треонина используют промышленный мутантный штамм *E. coli* (энтеробактерии), где система регуляции биосинтеза аминокислоты основана на принципе дифференциальной регуляции изоферментами. Этот штамм — тройной ауксотроф. У него изменен 1 фермент цепи биосинтеза (нечувствительный к треонину), отсутствуют механизмы репрессии («хроническое голодание» по изолейцину), при помощи методов генной инженерии треониновые гены размножены на плазидах, что значительно увеличило продуктивность штамма.

**С3 19:** Интерфероны – группа эндогенных гликопротеидов, которые оказывают неспецифическое противовирусное действие. На современном этапе широко развито промышленное производство интерферонов на основе природных источников.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- синтез различных классов интерферона человека в генетически сконструированных клетках микроорганизмов;
- проблемы стандартизации.

**Эталон ответа.** Для получения больших количеств ИФН используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса, т.е. создают систему вирус-клетка.

Из клетки человека изолирован ген, ответственный за биосинтез ИФН. Экзогенный человеческий ИФН, получают, используя технологию рекомбинантной ДНК:

1. Из лейкоцитов человека выделяют мРНК, фракционируют ее по размерам, проводят обратную транскрипцию, встраивают в сайт модифицированной плазмиды.
2. Полученную плазмиду вводят в *E. coli*; образовавшиеся клоны подразделяют на группы, которые идентифицируют.

**С3 20:** Каротиноиды – широко распространенная группа природных пигментов, образуемых высшими растениями, водорослями и микроорганизмами. Получение  $\beta$ -каротина осуществляется химическим и микробиологическим методами. Микробиологический метод многостадийный, требует использования сложной питательной среды, стимуляторов каротинообразования.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- особенности выращивания штаммов-продуцентов;
- схему и регуляцию биосинтеза, образование витамина А из  $\beta$ -каротина.

**Эталон ответа.** Продуцент каротиноидов – мицелиальный гриб *Blaksleatrispora*. Микробиологический метод получения  $\beta$ -каротина многостадийный и требует использования сложной по составу кукурузно-соевой среды с растительными маслами, ПАВ и

стимуляторами каротинообразования ( $\beta$ -ионон, аминотетрагидропиридин является стимулятором синтеза ликопина и др.), которые добавляются в среду после окончания интенсивного роста биомассы. Условия культивирования: сначала отдельное, а затем совместное выращивание разнополюх штаммов в ферментере 6-7 суток, при интенсивной аэрации и температуре 26 °C. Если из измельченного мицелия экстрагировать  $\beta$ -каротин подсолнечным маслом, то можно использовать его в виде масляных растворов. Применяя экстракцию органическим растворителем с последующей кристаллизацией, получают  $\beta$ -каротин в кристаллическом виде. Витамин А (ретинол) образуется под воздействием на  $\beta$ -каротин фермента каротиноксидазы.

**СЗ 21:** Вакцины – препараты для создания активного искусственно приобретенного иммунитета с целью профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Вакцины классифицируют в зависимости от природы, характера и способа получения на живые, неживые (инактивированные) и комбинированные. Можно классифицировать вакцины по виду получаемой лекарственной формы.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- традиционные методы получения живых и инактивированных вакцин, генно-инженерные живые вакцины (примеры);
- функции компонентов вакцины.

**Эталон ответа.** Живые аттенуированные вакцины, получаемые путем культивирования штамма либо в курином эмбрионе, либо в других культурах животных клеток. Примером дивергентной вакцины (с общим протективным антигеном у непатогенного для человека микроорганизма и с патогенным для человека возбудителем инфекции) служит вакцина против натуральной оспы человека, в которой использован непатогенный для человека вирус оспы коров. Кроме того, это и БЦЖ-вакцина (с родственными в антигенном отношении микобактериями бычьего типа). Рекомбинантные вакцины (выделенный ген вируса встраивают с помощью вектора в дрожжевую клетку или в клетку кишечной палочки), к примеру, вакцина против гепатита В.

Кроме того, существуют комбинированные вакцины, в частности АКДС (дифтерийный, столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены).

Неживые вакцины (инактивированные) включают в себя убитые культуры патогенных бактерий или вирусов (цельноклеточные, цельновирусные вакцины) или комплексы из патогенных микробов с протективными антигенами (субклеточные, субвирионные вакцины). В молекулярных вакцинах антиген находится в виде фрагментов его молекул, определяющих специфичность антигенности, т.е. в виде эпитопов, детерминант.

В состав вакцины входят: **действующий компонент** (специфический АГ); **консервант** (определяет стабильность вакцины при ее хранении и не допускает размножения случайно попавшей микрофлоры – мертиолят 1:10000, формалин и др.); **стабилизатор** (предохраняет АГ от разрушения – сахарозо-агар-желатина); **адъювант** (повышает иммуногенность АГ – полимерный носитель, липиды, эмульгаторы, полиоксидоний и др.)

**СЗ 22:** В основе современной инженерной энзимологии лежит применение ферментов и ферментных систем микроорганизмов, однако, их технологическое использование имеет вполне конкретные ограничения: лабильность ферментов, дороговизна и большая трудоемкость при их очистке, однократность их использования, в ряде случаев наличие коферментов. Имобилизация ферментов решает эти проблемы.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- принципы создания биокатализаторов второго поколения – «Систем, открытых для усложнения».

**Эталон ответа.** В настоящее время активно разрабатываются подходы к созданию «систем, открытых для усложнения». В этом случае в одном биореакторе иммобилизуются синтезирующий определенное вещество продуцент и фермент, трансформирующий это вещество. Пример, одновременная иммобилизация м/о *Penicillium chrysogenum* продуцента бензилпенициллина и выделенного из *E. coli* фермента пенициллинацилазы. В результате из синтезированного пенициллина образуется продукт его ферментативного гидролиза 6-АПК – ключевое соединение для синтеза новых пенициллинов. Система может быть вновь «усложнена» включением в нее еще одного иммобилизованного фермента – иммобилизованной синтетазы из м/о *Xanthamonas* sp., катализирующего присоединение к 6-АПК новых радикалов. Следовательно, получение новых полусинтетических антибиотиков.

**С3 23:** В настоящее время аминокислоты как ЛС завоевали себе довольно значительный сегмент от общего объема фармацевтической продукции. Биологически активными являются только L-стереоизомеры аминокислот. Чистые L-аминокислоты находят свое применение в медицине в качестве самостоятельных лечебных препаратов (L-метионин), в составе смесей для парентерального питания и др. Аминокислоты получают различными способами: биологическим, химическим, химико-энзиматическим, микробиологическим.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- преимущества химико-энзиматического синтеза аминокислот;
- примеры получения аминокислот с помощью иммобилизованных клеток и ферментов.

**Эталон ответа.** Преимущества: получение аминокислоты в L-форме, следовательно, отсутствие затрат на разделение рацемической смеси.

2. Уменьшение количества стадий, использующих агрессивные, токсические соединения в качестве исходных веществ, катализаторов при химическом синтезе предшественника (карбоновой кислоты)

3. Снижение побочных продуктов, следовательно, удешевление очистки целевого продукта.

4. Снижение риска для работы персонала и окружающей среды, по сравнению с чисто химическим способом получения.

Химико-энзиматический метод проводят в 2 этапа. Сначала химическим синтезом получают предшественник аминокислоты, например карбоновую кислоту, а затем осуществляют биотрансформацию предшественника ферментами живых клеток. Таким путем можно получать, например, аспарагиновую кислоту на основе фумаровой (карбоновой кислоты) при помощи иммобилизованного фермента аспартазы, выделенного из *E. coli* или целой иммобилизованной клетки *E. coli*, содержащей аспартазу при пропускании аммиака, рН 8,6. Другой пример получение фенилаланина на основе коричной кислоты (м/о дрожжевые клетки, содержащие фермент – фенилаланинаминамилазу).

**С3 24:** Природные запасы лекарственных растений уменьшаются, а синтез БАВ либо не осуществлен, либо нерентабелен. Поэтому технология получения биомассы на основе культуры клеток растений, для дальнейшего извлечения БАВ, приобретает большое значение для производства лекарственных средств. Для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма разрабатываются методы иммобилизации и трансформации.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- основное условие и методы иммобилизации растительных клеток
- преимущества иммобилизованных клеток растений по сравнению с суспензионными культурами.

**Эталон ответа.** Одним из основных условий при иммобилизации клеток – выделение метаболита в питательную среду, из которой он может быть легко извлечен. В отличие от

клеток животных и м/о растительные клетки (с целлюлозосодержащими стенками) могут быть иммобилизованы на полимерах. Клетки каллусной культуры встраивают в носители: альгинат кальция, агарозные шарики, карафинан калия, ПАА или внедряют в трехмерные сетчатые структуры из нейлона, полиуретана. Носитель с ККР помещают в ПС клетки при этом остаются живыми, они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.

**Преимущества** иммобилизованных ККР по сравнению с суспензионными культурами:

1. Многократное использование биомассы.
2. Четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма.
3. Увеличение продолжительности культивирования на стадии продуцирования.
4. Получение большого количества вторичных метаболитов.
5. Сокращение времени ферментации.
6. Увеличение срока работы ККР.

**СЗ 25:** Седиментация – один из методов разделения гетерогенных систем (под действием силы тяжести), применяемый в биотехнологическом производстве на этапах первичного выделения целевого продукта. Скорость процесса зависит от плотности культуральной жидкости, плотности выделяемых частиц, их диаметра и других факторов.

*В условиях поставленной задачи:*

- определить скорость осаждения частиц дрожжевой суспензии при  $t=35^{\circ}\text{C}$ , с плотностью  $920 \text{ кг/м}^3$ , плотность клеток (агломерированных частиц)  $1020 \text{ кг/м}^3$ . Вязкость суспензии  $2,0 \times 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$  при  $t=35^{\circ}\text{C}$ , диаметр частиц  $6 \times 10^{-6} \text{ м}$ .

**Эталон ответа:**

**Скорость осаждения частиц (по закону Стокса)**

$$W_{\text{ос}} = \frac{d_k^2 (S_1 - S_c) g}{18\mu_c} =$$

$$= \frac{(6 \cdot 10^{-6})^2 (1020 - 920) 9,8}{18 \cdot 2 \cdot 10^{-3}} = 9,8 \cdot 10^{-7} \text{ м/с.}$$

**СЗ 26:** В фармацевтическом производстве витаминной продукции ведущее положение занимают химические методы, но в ряде производств полноправными конкурентами выступают биотехнологические методы. Их использование более предпочтительно в связи с возможностью сокращения части стадий химического синтеза за счет использования высокоактивных штаммов суперпродуцентов, а также с ужесточением экологических требований к фармацевтическому производству.

*В условиях поставленной задачи обоснуйте:*

- микробиологический синтез пантотеновой кислоты ( $\text{B}_3$ ), витамина РР (никотиновой кислоты).

**Эталон ответа.** Наиболее важной коферментной формой витамина  $\text{B}_3$  является кофермент ацетилирования КоА. Значительные количества КоА способны продуцировать актиномицеты. В промышленность внедряются методы получения пантотеновой кислоты из  $\beta$ -аланина и пантотеата калия с помощью иммобилизованных клеток бактерий. Успехи достигнуты в получении КоА с использованием мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* (до 3 г на литр).

Биотехнологический способ получения коферментной формы никотиновой кислоты (НАД) – выделение (экстракция) его из микроорганизмов (пекарских дрожжей). Для повышения содержания НАД в питательную среду добавляют предшественники: аденин или саму никотиновую кислоту (получают 12 мг НАД на 1 г клеток (по сухой массе)).

Использование *Brevibacterium ammoniagenes* с одновременным увеличением проницаемости мембраны клеток микроорганизмов с помощью ПАВ позволяет получать НАД до 6 г/л.

**С3 27:** Основой расчета технологических и конструктивных параметров промышленных биореакторов являются экспериментальные данные, получаемые на опытных ферментационных установках.

*В условиях поставленной задачи:*

- сравните два типа биореакторов для глубинного культивирования микроорганизмов: биореактор с механическим перемешиванием и эрлифтный биореактор по следующим показателям: интенсивность перемешивания питательной среды, воздействие на клетки, диспергирование газа, содержание кислорода в  $\text{кг/м}^3 \times \text{ч}$ .

**Эталон ответа.** Наибольшее распространение в практике экспериментальных ферментационных установок получили ферментеры с механическим перемешиванием и эрлифтные ферментеры, которые обеспечивают в объеме до 100 литров широкого варьирования режима перемешивания и аэрации среды. В биореакторах с механическим перемешиванием происходит интенсивное перемешивание среды и диспергирование газа. Однако наблюдается механическое воздействие на клетки. Содержание кислорода в среде составляет  $5\text{-}30 \text{ кг/м}^3 \times \text{ч}$ .

При использовании эрлифтного аппарата отсутствуют вращающиеся части, происходит мягкое механическое воздействие на клетки. Содержание кислорода в среде составляет  $2\text{-}8 \text{ кг/м}^3 \times \text{ч}$ .

Следовательно, при выборе из указанных типов биореакторов необходимо учитывать чувствительность клеток к механическим воздействиям и их потребность в кислороде (дыхательная активность).

**С3 28:** Центрифугирование – один из методов разделения гетерогенных систем (под действием центробежной силы), применяемый в биотехнологическом производстве на этапах первичного выделения целевого продукта. Скорость процесса зависит от свойств культуральной жидкости, вида используемых центрифуг.

*В условиях поставленной задачи:*

- определите фактор разделения трубчатой центрифуги для отделения биомассы растительных клеток, имеющей барабан длиной  $L=1000$  мм, внутренним диаметром  $d=800$  мм, число оборотов  $n=5\ 000$  оборотов в минуту.

**Эталон ответа.**

**Фактор разделения**

$$f = \frac{d/2 \cdot n^2}{900} = \frac{0,1 \cdot (5 \cdot 10^3)^2}{2 \cdot 900} = 1,39 \cdot 10^3.$$

**С3 29:** Эритропоэтин – гликопротеин необходимый для созревания эритроцитозидных клеток. Белок видоспецифичен, вырабатывается в почках. Препараты эритропоэтина применяются при состояниях угнетения кроветворения. Технологией рекомбинантной ДНК может быть получен рекомбинантный эритропоэтин человека, сохраняющий свою видоспецифичность.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- источники получения;
- этапы технологии получения рекомбинантного эритропоэтина;
- параметры стандартизации.

**Эталон ответа.** Способ получения рекомбинантного эритропоэтина (гликопротеина) имеет важную особенность – ген эритропоэтина человека встраивается не в микробные, а в

животные клетки (яйцеклетки китайского золотистого хомячка), где белок может быть гликозилирован. При этом продуцентом эритропоэтина является монослойная культура этих клеток.

Эритропоэтин выпускается в виде раствора для в/в и п/к введения: прозрачная жидкость [по 500 МЕ или 2000 МЕ в ампулах по 1 мл, по 5 ампул в контурных ячейковых упаковках]. В 1 мл раствора содержатся: действующее вещество – эпоэтин бета (рекомбинантный эритропоэтин человека); вспомогательные компоненты – буфер изотонический цитратный (натрия хлорид, натрия цитрат, вода для инъекций, кислота лимонная), альбумина раствор 10%. Биологический метод оценки активности.

**СЗ 30:** Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин) витамин роста функционирует в коэнзимных формах: ФМН и ФАД. При промышленном получении рибофлавина используют культуры дрожжеподобных грибов, имеющих серьезный недостаток, который ликвидируется частыми рассевами штамма на твердые среды с последующим отбором колоний с высокой активностью.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- основные продуценты, в чем заключается их недостаток;
- пути интенсификации процесса биосинтеза.

**Эталон ответа.** Именно при выделении рибофлавина в культуральную жидкость было открыто явление сверхсинтеза. При промышленном получении рибофлавина используют культуры дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*, синтезирующих до 3,8 и 6,4 г/л рибофлавина соответственно. Серьезным недостатком этих культур является их нестабильность при хранении на твердых средах во всем диапазоне температур – от комнатной до температуры лиофилизации, в результате чего они теряют способность к сверхсинтезу рибофлавина. Следовательно, систематически делают рассев.

Сейчас вместе с вышеуказанными культурами используется мутантный штамм продуцент *Bacillus subtilis* с нарушенной регуляцией синтеза витамина В<sub>2</sub>. Этот штамм устойчив к наиболее сильному антиметаболиту рибофлавина – розеофлавинолу. При культивировании *Bacillus subtilis* на среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в культуральной жидкости накапливается 3,5 – 4,5 г/л рибофлавина, а время ферментации сокращается в 3 раза.

Возможен и химический синтез рибофлавина, в качестве биокатализатора используют сухие клетки бревибактерий. При биосинтезе с суспензией сухих клеток время синтеза ФАД составляет всего 15 – 17 часов.

**СЗ 31:** Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства – многостадийный процесс, требующий создания стерильных условий. При этом необходимо не допустить контаминации целевого продукта. Одним из возможных источников загрязнения может быть технологический воздух.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- схему подготовки газового потока, подаваемого в ферментер, для осуществления биосинтеза;
- мероприятия, проводимые персоналом с соблюдением техники безопасности для эффективности работы фильтров.

**Эталон ответа.** Поступающий из окружающей среды воздух содержит от 1000 до 100 000 клеток микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup>, среди которых могут встречаться и патогенные микроорганизмы. Чтобы не допустить контаминации культуральной жидкости, индивидуальные фильтры не должны пропускать микроорганизмы размером более 0,25 микрона (мкм). Для сравнения, размеры, например, кокков составляют 0,5-1,5 мкм, кишечной палочки — 0,4-0,8 мкм. При этом существует так называемый коэффициент проскока, поэтому 100% стерилизация не всегда возможна. Фильтры стерилизуют острым

паром при 120-130 °С в течение 30 мин. Для проверки эффективности стерилизации проводят биологический анализ проб (степень задержки должна быть 99,999%).

**СЗ 32:** Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности — это система устройств периодического или непрерывного действия. Системный подход позволяет реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам конкретного производства, выбрать необходимые методы и средства автоматического контроля протекания процесса биосинтеза.

*В условиях поставленной задачи предложите:*

- примеры конструкции ферментера («обвязки ферментера»), средств автоматического контроля в зависимости от особенностей культивируемого биообъекта;
- основные мероприятия по обеспечению охраны труда и ТБ при работе с биореакторами.

**Эталон ответа.** Объем ферментационных аппаратов для промышленного производства, например, антибиотиков, колеблется от 1 до 150 м<sup>3</sup>. Цилиндрическая поверхность снабжена так называемой тепловой рубашкой, представляющей собой систему змеевиков для обеспечения постоянной температуры. Ферментер снабжен мешалкой (пропеллерной, турбинной) для обеспечения хорошего массообмена. Подача стерильного воздуха для аэробов осуществляется устройством – барботером. В нижней части аппарата имеются отбойники, необходимые для создания вихревых потоков, которые препятствуют образованию «застойных зон».

Современные ферментеры снабжены контрольно-измерительной аппаратурой, которая обеспечивает контроль рН, температуры внутри ферментера, количества кислорода в среде, давления внутри аппарата и т.д.

Мероприятия: герметизация оборудования, контроль давления и др.

**СЗ 33:**Центрифугирование как метод отделения целевых продуктов широко используется в биотехнологии для выделения из культуральной жидкости клеток высших растений, микроорганизмов.

*В условиях поставленной задачи укажите:*

- преимущества и недостатки метода, виды используемого оборудования
- общие правила техники безопасности при работе с центрифугами.

**Эталон ответа.** Центрифугирование метод разделения гетерогенных систем в поле центробежных сил. В БТ используется для осветления суспензий с содержанием твердой фазы до 5-10%. Для первичного выделения из культуральной жидкости клеток меристемы растений, биомассы дрожжей, бактерий, грибов. Для отделения антибиотиков, витаминов, ферментов и др. Для разделения эмульсий, образующихся при экстракции (очистка целевого продукта). Виды центрифуг (непрерывно-циклического действия, непрерывного действия). Достоинства метода: большая производительность и эффективность разделения (выделение из культуральной жидкости частиц размером до сотых долей микрометра). Недостатки: воздействие на клетку центробежной силы; нагрев; трудность в герметизации, следовательно, сложность в обеспечении асептических условий; потери при сепарировании могут составлять до 30%; электротраты до 20кВтч/т.

ТБ:

1. работать с центрифугой имеет право персонал, не имеющий медицинских противопоказаний, прошедший производственное обучение, инструктаж на рабочем месте, т.е. иметь допуск к работе
2. для исключения опасности электротравмы должен быть оборудован контур заземления



3. подвижные и вращающиеся части оборудования должны иметь защитные кожухи и ограждения, исключая возможность получения травм персонала
4. загрузка ротора проводится надлежащим образом во избежание его разбалансировки или разрушения
5. категорически запрещаются дальнейшие операции с центрифугой до момента полной остановки ротора.

**3) Типовые задания для оценивания результатов сформированности компетенции на уровне «Владеть»** (решать усложненные задачи на основе приобретенных знаний, умений и навыков, с их применением в нетипичных ситуациях, формируется в процессе практической деятельности):

**Перечень навыков:**

1. Владеть методами обработки текстовой и графической информации.
2. Владеть навыками работы с нормативной, справочной и научной литературой.
3. Владеет навыками публичной речи, аргументации, ведения дискуссии.
4. Владеть методиками работы в различных операционных системах, с базами данных с экспертными системами для решения профессиональных задач.
5. Владеть методиками постадийного контроля качества при производстве и изготовлении биотехнологических лекарственных средств.
6. Учитывать влияние биотехнологических факторов на эффективность технологического процесса и поддерживать оптимальные условия для биосинтеза целевого продукта.
7. Владеть правилами расчетов оптимальных технологических параметров, параметров ферментации и их корректирования;
8. Владеть техникой проведения всех этапов иммобилизации и использования иммобилизованных биообъектов.
9. Осуществлять подбор компонентов питательной среды, в зависимости от изменяющихся условий культивирования.

**Ситуационные задачи** (усложненные, с применением приобретенных знаний и навыков для решения в нетипичных ситуациях), формируется в процессе практической деятельности):

**Ситуационная задача № 1.**

Проконсультируйте специалиста, обратившегося с вопросом оценки подлинности, допустимых примесей и количественного определения препарата инсулина человека, получаемого по технологии рекомбинантной ДНК через проинсулин.

**Эталон ответа.** Рекомбинантный инсулин, синтезируемый в микробной клетке *E. Coli* идентичен инсулину человеческой ткани. Однако его выделение из клетки требует ее разрушения. При этом его выделение и очистка требуют особой тщательности с целью удаления различных примесей в том числе микробных липо- и гликопротеинов. Примеси в рекомбинантном инсулине вследствие их токсичности могут вызвать нежелательные побочные эффекты.

В этой связи в рекомбинантном инсулине определяются и нормируются иммунореактивные полипептиды, проинсулинподобная иммунореактивность (методом РИА), ДНК штамма продуцента (метод гибридизации), А-21-дезамидоинсулин и другие родственные соединения (ВЭЖХ), высокомолекулярные белки (ВЭЖХ), бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест). Идентификация инсулина проводится с использованием методов ВЭЖХ, пептидного картирования, биологическим методом.

Количественное определение проводится методом ВЭЖХ, кроме того, оценивается биологическая активность (гипогликемическое действие).

### **Ситуационная задача №2.**

Дайте объяснение факту, что после применения людьми пищевой добавки аминокислоты триптофана, у людей отмечалось резкое увеличение встречаемости эозонофилии – миалгии, сопровождающейся изнурительными мышечными болями и спазмом дыхательных путей.

Триптофан был получен методом биосинтеза с помощью генетически трансформированных бактерий. Для сверхсинтеза триптофана компания сочла, что новый штамм идентичен предыдущему и не провела валидации.

**Эталон ответа.** На биотехнологическом предприятии может происходить замена штамма продуцента. Часто это «дочерний» штамм, полученный генетиками из штамма, уже используемого предприятием, но образующий больше целевого продукта, т.е. более рентабельный. В этом случае обязательна валидация, хотя она требует затраты сил, времени и средств.

Более высокая активность нового продуцента означает наличие изменений в его метаболизме. Эти изменения могут приводить не только к большей продуктивности, но и к сдвигам в наборе и концентрации ряда метаболитов у продуцента.

Схема выделения и очистки целевого продукта, согласно регламенту, может в новых условиях оказаться неудовлетворительной. Это может привести к появлению в готовом продукте токсичных примесей.

В описанном случае триптофан содержал метаболиты триптофана, в том числе 1-1'-этилен-бис-триптофан, который в опытах на крысах показал патологию сходную с симптомами при применении триптофана у людей.

### **Ситуационная задача № 3.**

Химическую иммобилизацию стрептокиназы проводили следующим образом: в качестве полимера – носителя использовали декстрол с молекулярной массой 60 000. Приготовили раствор декстрола, приготовили раствор стрептокиназы, затем к раствору стрептокиназы добавили раствор декстрола, перемешивали в течение часа. Однако химическая иммобилизация не произошла. Фермент не присоединился к поверхности носителя. Объясните, на каком этапе была допущена ошибка.

**Эталон ответа.** Фермент не присоединился к носителю в результате отсутствия на его поверхности реакционных групп, способных связаться с белком. Необходимо предварительно провести активацию поверхности декстрола, обработав его перйодатом калия. При этом спиртовые группы окисляются до альдегидных, которые затем взаимодействуют с аминокруппами фермента с образованием азометиловой связи.

### **Ситуационная задача № 4.**

В процессе биосинтеза ряда препаратов на биотехнологическом предприятии образуются жидкие отходы, содержащие полисахариды. При максимальных нагрузках в системе биологической очистки сточных вод возникли трудности в плане ее недостаточной эффективности. Какие действия необходимо предпринять по повышению эффективности работы аэротенков при максимальных нагрузках?

**Эталон ответа.** При максимальных («шоковых») нагрузках системы биологической очистки сточных вод биотехнологического предприятия, необходима корректировка работы аэротенков с целью повышения их эффективности. В частности, в рабочие периоды в аэротенки следует вносить высокоактивные штаммы деструкторы («бактериальные закваски»). Они значительно усилят пропускную способность и эффективность очистки жидких отходов в аэротенках.

С учетом профиля биотехнологического предприятия можно рекомендовать специальный препарат: «Thermobac» - для окисления полисахаридов.

Ориентировочная доза «бактериальной закваски» из живых клеток должна составлять 100 мг на 1 м<sup>3</sup> сточной жидкости.

### **Ситуационная задача №5.**

При выращивании продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* в питательную среду не добавили гомосерин и треонин. Выход готового продукта был ничтожно мал. Обоснуйте причину низкого выхода лизина.

**Эталон ответа.** При создании данного продуцента у коринебактерий были нарушены механизмы внутриклеточной регуляции биосинтеза лизина. Лизин и треонин синтезируются из предшественника - аспарагиновой кислоты. Синтез предшественника лизина ингибируется только тогда, когда в клетке образуется одновременно избыточная концентрация и лизина и треонина. По отдельности ни лизин ни треонин не ингибируют активность первого фермента (аспартокиназы). Чтобы вызвать сверхсинтез лизина, необходимо нарушить синтез треонина. Так как треонин не синтезируется продуцентом (ауксотрофный мутант), необходимо добавление треонина в питательную среду. При его отсутствии замедляется рост микроорганизмов, а, следовательно, и выход готового продукта.

### **Ситуационная задача № 6.**

Биотехнологическое предприятие планирует производство препаратов пробиотиков.

Какие требования предприятие будет предъявлять к приобретаемым штаммам продуцентов пробиотиков? Какие компоненты питательных сред предприятие будет закупать, в чем их особенность для культивирования продуцентов пробиотиков?

**Эталон ответа.** Для получения пробиотиков разрешены штаммы только определенных видов микроорганизмов, имеющие следующие свойства:

- эффективные антагонистические свойства, желательны, чтобы они продуцировали пероксиды и антибиотикоподобные вещества;
- способность прикрепляться к эпителию кишечника (пристеночные микроорганизмы), образуя на его поверхности плотную биопленку, которая будет препятствовать фиксации патогенных микроорганизмов;
- штаммы не должны гидролизовать кишечную слизь, обладающую протективным действием и не должны повреждать клетки кишечного эпителия (холециты);
- штаммы должны быть технологичны, т.е. хорошо расти и размножаться на искусственных питательных средах, также штаммы должны быть криорезистентны и выдерживать процедуру высушивания.

Все отобранные штаммы должны быть проверены на патогенность и токсичность *in vitro* на культуре клеток холецитов, на чувствительных животных.

Для культивирования продуцентов пробиотиков следует использовать сырье, разрешенное к применению в пищевой промышленности. Это связано с тем, что

получаемые препараты, штаммы которых выращены на этих средах, используются для внутреннего применения.

Как источник аминокислот в состав питательной среды предприятию следует приобретать триптол или пептол, получаемый из белка молока (казеина). Источником витаминов, пиримидиновых и пуриновых оснований будет являться дрожжевой экстракт из дрожжей пивных либо пекарских. Источниками микроэлементов будут являться соли магния, марганца, цинка. Источником энергии – лактоза или глюкоза.

#### **Ситуационная задача № 7.**

В процессе культивирования *Penicilliumchrysogenum* в среде накопились серосодержащие соединения не  $\beta$ -лактамного характера, близкие к цистеину и метионину. На каком этапе биосинтеза антибиотика было допущено нарушение технологии?

**Эталон ответа.** В питательную среду не был добавлен предшественник – ФУК (фенилуксусная кислота). Синтез того или иного пенициллина зависит от наличия специфического вещества в среде (предшественника), который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления.

ФУК добавляется дробно (так как большая концентрация его в среде оказывает токсическое действие на продуцент), в концентрации от 100 до 500 мкг/мл через 24 часа развития *Penicilliumchrysogenum*. При таких условиях обеспечивается наибольший выход (до 95% бензилпенициллина), который через 72 часа развития может достигать 500-1000 мкг/мл.

Добавление фенилуксусной кислоты в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 часа его развития.

#### **Ситуационная задача № 8.**

При биосинтезе пенициллина с целью увеличения роста биомассы микроорганизмов в питательную среду был добавлен лизин. Однако это привело к снижению синтеза пенициллина. Объясните почему?

**Эталон ответа.** Одним из предшественников лизина является L, $\alpha$ -аминоадипиновая кислота. Эта же кислота входит в состав LLD – трипептида, из которого собирается молекула пенициллина. Избыток лизина ингибирует свой собственный биосинтез, а также биосинтез предшественника, т.е. L, $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты, а, следовательно, останавливается биосинтез пенициллина.

#### **Ситуационная задача № 9.**

Предложите рациональную систему жизнеобеспечения суперпродуцента, используемого для получения  $\beta$ -лактамного антибиотика- бензилпенициллина в условиях биотехнологического производства.

**Эталон ответа.**

1. Суперпродуцент - *Penicilliumchrysogenum*.
2. Условия ферментации – асептические.
3. Тип ферментации – глубинная аэробная ферментация.
4. Период ферментации 7-10 суток.
5. Тип биореактора – барботажный, эрлифный.
6. Перемешивание.
7. Оптимальная температура среды в ферментере - 24-25<sup>0</sup> С.

#### 8. Характер питательной среды – комплексная.

В качестве источников углерода: глюкоза, лактоза или галактоза (в процессе ферментации должны подаваться непрерывно). Однако следует помнить, быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков, следовательно целесообразно добавлять медленноутилизирующиеся полисахариды (крахмал).

В качестве источников азота: аммоний и другие легкоутилизируемые источники азота. Они усиливают рост продуцента, но отрицательно влияют на его биосинтез. Следовательно, целесообразно использовать 1-4% кукурузный экстракт, соевую, хлопковую муку, белково-витаминный концентрат, так как они медленно расщепляются в процессе ферментации (из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония).

В качестве источников серы: тиосульфат натрия.

Источник меди – усиливает ферментационный процесс, но избыток меди замедляет процесс биосинтеза антибиотика, следовательно, необходимо введение источника железа для контроля внутриклеточной регуляции.

Животный жир (0,2-0,5%) - как пеногаситель.

Необходимость введения предшественника – ФУК (фенилуксусной кислоты) в концентрации от 100 до 500 мкг/мл через 24 часа развития *Penicilliumchrysogenum*, дробно, так как большая концентрация ФУК в среде оказывает токсическое действие на продуцент.

#### Ситуационная задача № 10.

При получении 2-кето-L-гулоновой кислоты (2 КГК) - важнейшего промежуточного продукта биосинтеза *витамина С* (аскорбиновой кислоты) было проведено совместное культивирование мутантных штаммов продуцентов *Erwinia punctata* и *Corynebacterium* sp.. Наблюдалось ингибирование синтеза 2 КГК, резко снизился ее выход до 30%. Обоснуйте предназначение каждого из штаммов продуцентов. Объясните, в чем нарушение технологии биосинтеза. Какие мероприятия позволяют значительно сократить потери целевого продукта?

**Эталон ответа.** Использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез аскорбиновой кислоты. Одним из путей синтеза витамина С, является енолизация его важнейшего промежуточного продукта -2-кето-L-гулоновой кислоты (2КГК), которую, в свою очередь, получают методом двухстадийного микробиологического синтеза, состоящего из окисления d-глюкозы в 2,5-дикето-d-глюконовую кислоту (2,5-ДКДГК)- продуктивный микроорганизм *Erwinia punctata* и биотрансформации 2,5 ДКДГК в 2 КГК – продуктивный микроорганизм – *Corynebacterium* sp.

Нарушение технологии, повлекшее снижение выхода 2 КГК – совместное культивирование штаммов продуцентов. Культивирование должно быть последовательным, для сокращения потерь целевого продукта.

Культуральную жидкость после выращивания продуцента 2,5- ДКДГК (*Erwinia punctata*) необходимо стерилизовать. Из-за высокой термолабильности 2,5-ДКДГК клетки отделяют центрифугированием в асептических условиях с последующей фильтрацией через бактериологические фильтры. Более технологично с целью стерилизации применять поверхностно активные вещества (ПАВ).

#### Ситуационная задача № 11.

При проведении гибридной технологии (для получения моноклональных антител) биотехнолог проводил скрининг гибридных клеток. Обосновать использование биотехнологом селективной среды ГАТ.

**Эталон ответа.** Для скрининга гибридных клеток применяют селективную среду ГАТ, содержащую аминоптерин (противоопухольный препарат), блокирующий синтез нуклеотидов по основным путям, и предшественники запасных путей биосинтеза – гипоксантин и тимидин. На этой среде родительские миеломные клетки погибают, так как генетически дефектны по ферментам запасных путей биосинтеза нуклеотидов (ТК – тимидинкиназе или ГГФТ – гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазе), что делает их чувствительными к селектирующему агенту – среде ГАТ. Родители – лимфоциты, не слившиеся с миеломными клетками, тоже погибают, поскольку они не способны расти вне организма в заданных условиях.

Гибридные клетки сочетают в себе способность к неограниченному росту и к синтезу нуклеотидов по запасным путям и поэтому накапливаются в культуре. Таким образом, на среде ГАТ выживают *только гибридомы* (за счет использования гипоксантина как источника пуринов).

### **Ситуационная задача № 12.**

При биосинтезе витамина В<sub>12</sub> (продуцент *Propionibacterium shermanii* ) синтезировался *фактор В* (кобинамид). На каком этапе биосинтеза было допущено нарушение технологии.

**Эталон ответа.** В процессе биосинтеза в питательную среду через 72 часа после начала ферментации необходимо внести предшественник – 5, 6-диметилбензимидазол. Вероятного этого не было сделано, а при отсутствии 5, 6-диметилбензимидазола вместо В<sub>12</sub> синтезируется кобинамид.

### **Ситуационная задача № 13.**

При фильтровании культуральной жидкости актиномицетов (*Streptomyces griseus*) на барабанном вакуум-фильтре, оператор обратил внимание технолога на низкую скорость фильтрования и попросил консультацию как можно ускорить скорость фильтрования. Какие варианты увеличения скорости фильтрации предложил биотехнолог.

**Эталон ответа.** Биотехнолог рекомендовал: увеличить глубину разрежения; использовать барабанный фильтр с промывным слоем и постоянным удалением осадка. Также рекомендовал провести предварительную обработку культуральной жидкости – кислотную коагуляцию, так как стрептомицин устойчив в кислой среде.

### **Ситуационная задача №14.**

При культивировании изолированных тканей растения к экспланту в питательную среду добавили 6-БАП (6-бензиламинопурин), а затем через 6 часов 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту). Было обнаружено образование незначительного первичного каллуса. Ожидаемого роста каллусной ткани не наблюдалось, индуцировать морфогенез не удалось, даже при создании и контроле всех условий культивирования (подбор многокомпонентной питательной среды, оптимум освещенности - 1000 люкс, оптимальная температура - 26<sup>0</sup> С, влажность 60-70%, нормальная аэрация). Обоснуйте, на каком этапе культивирования изолированных тканей растения было допущено нарушение технологии, что привело к отсутствию дедифференцировки и индукции каллусогенеза.

**Эталон ответа.** Нарушение технологии культивирования изолированных тканей растения - на этапе внесения фитогормонов (их синтетических аналогов) к экспланту в

питательную среду. Вначале необходимо было ввести ауксины 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту), также могут использоваться ИУК (индолил-3-уксусная кислота), НУК ( $\alpha$ -нафтилуксусная кислота), а затем внести цитокинины 6-БАП (или кинетин, зеатин). Либо 2,4-Д и 6-БАП должны были бы быть внесены в питательную среду одновременно.

Обязательное условие дедифференцировки тканей экспланта и превращения их в каллусные клетки, (помимо повреждения, вызвавшего образование раневых гормонов, в частности, травминовой кислоты, за счет которых образовался и был обнаружен незначительный первичный каллус) - присутствие в питательной среде ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки клетки, подготавливают ее к делению. Затем, цитокинины инициируют деление клеток. Действие этих фитогормонов проявляется только при последовательном или одновременном внесении их в питательную среду.

### **Ситуационная задача № 15.**

На биотехнологическое производство поступил заказ на партию аминокислот для приготовления препарата «Панангин». В результате химического синтеза получена рацемическая смесь аминокислот. Какой метод рациональнее использовать для их разделения. Каким образом можно повысить экономичность процесса разделения?

**Эталон ответа.** В препарате «Панангин» аминокислоты используются в L-форме. Разделить рацемическую смесь аминокислот можно с помощью фермента аминоксилазы, который малочувствителен к типу аминокислот. Фермент реагирует с ацильными производными L-изомеров, не затрагивая D-изомеры. Исходные вещества модифицируют по аминогруппе, далее на эту смесь воздействуют аминоксилазой, которая гидролизует амидную связь только у L-изомера. В результате образуются свободная L- аминокислота, обладающая более высокой растворимостью, в сравнении с ацильным соединением. Смесь свободной L- аминокислоты и ацилированной D- аминокислоты разделяют простыми физическими методами, пользуясь их различной растворимостью. Оставшийся после разделения D-изомер, обычно при повышенной температуре рацемируют и снова вводят в реакцию с ацилазой.

С большей экономичностью процесс можно провести, используя иммобилизованные ферменты. Это позволит регенерировать фермент и использовать его вторично, а также получить аминокислоты без примеси фермента, что снижает стоимость их очистки.

### **Темы курсовых работ по Биотехнологии.**

1. Надлежащая производственная практика в биотехнологическом производстве.
2. Типовое аппаратурное оформление процесса биосинтеза. Обоснование его использования.
3. Питательные среды, применяемые в биотехнологии.
4. Суперпродуценты. Методы получения и хранения производственных штаммов микроорганизмов.
5. Методы выделения, концентрирования и очистки целевого продукта в биотехнологическом производстве лекарственных средств.
6. Применение мембранных технологии в биотехнологическом производстве лекарственных средств.
7. Сушка в производстве биологических лекарственных препаратов.
8. Иммобилизация биообъектов и ее применение в биотехнологии.
9. Использование методов иммобилизации в производстве лекарственных средств.

10. Биосенсоры. Методы получения и использование в медицине.
11. Способы получения ЛС антибиотиков.
12. Культура клеток и тканей растений, направление использования в биотехнологии.
13. Биотехнологическое производство рекомбинантных белков.
14. Производство лекарственных средств аминокислот.
15. Производство лекарственных средств ферментов.
16. Производство иммунобиологических лекарственных препаратов – вакцин и анатоксинов.
17. Производство иммунобиологических лекарственных препаратов – пробиотиков.
18. Информационное обеспечение, контроль и управление в биотехнологическом производстве лекарственных средств.