

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Институт фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра биотехнологии

Методические материалы по дисциплине:

Основы биотехнологии

основная профессиональная образовательная программа высшего
профессионального образования - программа специалитета

33.05.01 Фармация

Содержание

1. Аминокислоты как лекарственные средства биотехнологического производства.....	3
<i>1.1. Введение.....</i>	<i>3</i>
<i>1.2. Проведение практических занятий.....</i>	<i>3</i>
<i>1.3. Оценочные средства.....</i>	<i>5</i>
<i>1.4. Рекомендуемые информационные материалы.....</i>	<i>14</i>
<i>1.5. Терминологическая идентификация ключевых понятий по биотехнологии аминокислот.....</i>	<i>17</i>
2. Ферменты как лекарственные препараты биотехнологического производства, инженерная энзимология.....	19
<i>2.1. Введение.....</i>	<i>19</i>
<i>2.2. Проведение практических занятий.....</i>	<i>19</i>
<i>2.3. Оценочные средства.....</i>	<i>20</i>
<i>2.4. Рекомендуемые информационные материалы.....</i>	<i>28</i>
<i>2.5. Терминологическая идентификация ключевых понятий по биотехнологии ферментов.....</i>	<i>38</i>
3. Стероиды как лекарственные средства биотехнологического производства.....	40
<i>3.1. Введение.....</i>	<i>40</i>
<i>3.2. Проведение практических занятий.....</i>	<i>40</i>
<i>3.3. Оценочные средства.....</i>	<i>42</i>
<i>3.4. Рекомендуемые информационные материалы.....</i>	<i>52</i>
<i>3.5. Терминологическая идентификация ключевых понятий по биотехнологии стероидов.....</i>	<i>59</i>
4. Тестовые задания для прохождения промежуточной аттестации..	60
5. Вопросы для прохождения промежуточной аттестации.....	134
6. Ситуационные задачи для прохождения промежуточной аттестации.....	140

1. Аминокислоты как лекарственные средства биотехнологического производства

1.1. Введение

Материалы практикума необходимы студентам для правильного выбора тех звеньев биотехнологического процесса, которые определяют его максимальную эффективность.

Тема «Аминокислоты как лекарственные средства биотехнологического производства» посвящена биотехнологическим методам получения этих препаратов. Представленный материал включает также характеристики основных промышленных штаммов-продуцентов, особенности питательных сред и параметры их культивирования. На конкретных примерах показаны методы выделения, очистки и определения количественного содержания целевых продуктов. Подчеркивается преимущество использования биотехнологических методов в промышленном производстве чистых L-аминокислот.

Цель изучения темы: ознакомление студентов с биотехнологическими методами, используемыми в фармацевтической промышленности для получения L-аминокислот и комплексных препаратов на их основе. Понятие ауксотрофные мутантные штаммы. Регуляция внутриклеточного метаболизма микроорганизмов. Создание штаммов-суперпродуцентов.

1.2. Проведение практических занятий

Изучение темы распределено на 2 занятия. Первое занятие включает общий объем времени 2 часа 35 мин. с перерывом 15 мин. (2 часа 20 мин. рабочего времени).

ВВ! Студенты должны иметь предварительную информацию по подготовке к данной теме (обучающий диск, учебник и руководство к практическим занятиям, а также лекции).

Первое занятие строится следующим образом (хронокарта 1).

1. Введение (название темы, актуальность, проблемы качества и рентабельности производства)30 мин.
2. Входной контроль по блиц-тестам (5 вопросов) 10 мин.
3. Раздача ситуационных задач (по выбору преподавателя) и дополнительных учебных материалов (пособие № 6) 5 мин.
4. Рекомендации преподавателя по работе с информационным материалом 25 мин.
5. Перерыв15 мин.
6. Самостоятельная работа студента (это часть аудиторной работы проводится под консультативным руководством преподавателя, а её завершение - остается в качестве самостоятельной работы вне аудитории для каждого студента в группе) 60 мин.
7. Подведение итогов занятия с отметкой в журнале, сбор методических материалов10 мин.

Пояснения к занятию.

а). В случае отсутствия студента на занятии, входной тест заменяется в дальнейшем на вопросы входного контроля на отработках.

б). В случае отрицательного результата по тесту при подписании успешно выполненной работы студенту предлагаются 2-3 дополнительных вопроса по теме (могут быть вопросы из входного контроля).

Всем студентам независимо от предложенной задачи обратить внимание на:

- использование различных методов получения аминокислот при сравнительном анализе рентабельности производства (экономический аспект), улучшения качества целевого продукта (степени чистоты) и возможных экологических проблем утилизации отходов производства (стр. 10-20)
- пути биосинтеза и методы селекции продуцентов отдельных аминокислот при получении ауксотрофных мутантов на примерах лизина и треонина (стр. 23-28).
- специфику постадийного биосинтеза чистых L-аминокислот методом прямого микробиологического синтеза (стр.30, 33.)
- специфику ферментационного процесса получения аминокислот и управление параметрами биосинтеза (стр. 34,36,38).
- проблему стерилизации питательных сред, ферментера и всех коммуникаций, а также технологического воздуха (стр.32-33).
- специфику питательных сред при выращивании посевного материала и ферментационного цикла (стр.33 - 35).

Также обратить особое внимание на выделение целевого продукта с помощью иммобилизации культуры клеток.

Всем студентам независимо от предложенной задачи обратить внимание на разделение на разделение изомеров аминокислот с помощью иммобилизованной аминоксилазы.

Второе занятие включает общий объем времени 2 часа 35 мин. с перерывом 15 мин. (2 часа 20 мин. рабочего времени). Студент приходит на занятие с подробным протоколом решения поставленных задач и технологическим обоснованием (все записи должны быть представлены в тетради с обозначением ФИО и № группы на обложке для регистрации выполнения задания и подписи преподавателя в случае положительной оценки работы).

Занятие строится следующим образом (хронокарта - 2).

1. Проверка готовности к защите представленной работы (наличие подробного конспекта, графики, рисунки, комментариев в аспекте поставленных задач и решений) 15 мин.
2. Защита работы: каждому студенту дается около 8 мин. на устное выступление с планом защиты (по выбору преподавателя - 5 студентов из группы) 50 мин.
3. Перерыв 15 мин.
4. Продолжение защиты работ (5 студентов из группы по выбору преподавателя)50 мин.
5. Подписание работ с отметкой в журнале* (для студентов, которые не выступали с устным докладом). Объявление новой темы следующего

занятия для домашней подготовки (диск, учебник, руководство к
практическим занятиям по фармацевтической биотехнологии, лекции)
.....25 мин.

**Для подписания работы студенту необходимо предоставить оформленную рабочую тетрадь (более подробно - см. ниже) и расширенный протокол ответа по выданной преподавателем задаче. При этом студент должен быть готовым ответить на любой вопрос по теме занятия, включая контрольные вопросы и рабочую тетрадь.*

1.3. Оценочные средства

1.3.1. Входной контроль по теме «Аминокислоты как лекарственные средства биотехнологического производства» (допускается только один правильный ответ)

Вариант 1

1. Какая из ниже представленных аминокислот не имеет оптических изомеров?
 - а. глутамин
 - б. цистеин
 - в. метионин
 - г. глицин
 - д. аланин
2. Что отличает химическое производство аминокислот от микробиологического?
 - а. исходное сырье
 - б. температура, время процесса
 - в. получение рацематов
 - г. дорогостоящие катализаторы
 - д. верно все
3. Укажите лекарственный препарат на основе аминокислот, применяемый при начальных стадиях развития катаракты (входит в состав глазных капель - витайодурол)
 - а. метионин
 - б. цистеин
 - в. тимоген
 - г. румалон
 - д. эмбриобласт
4. Укажите регуляторный элемент, воспринимающий сигнал обратной связи в случае проявления механизма ретроингибирования:
 - а. промотор
 - б. информационная РНК
 - в. структурный белок
 - г. аттенуатор
 - д. белок репрессор
5. В соответствии с фазами роста микроорганизма наиболее активный синтез треонина происходит:
 - а. в лаг-фазе

- б. в экспоненциальной фазе
- в. в стационарной фазе
- г. в фазе аутолиза
- д. верно все

Вариант 2

1. Какая из представленных ниже аминокислот применяется в терапии нервных и психических заболеваний в качестве лекарственного препарата?
 - а. глутамин
 - б. цистеин
 - в. метионин
 - г. глицин
 - д. церебролизин
2. Выделите наиболее часто применяемый метод получения аминокислот по критериям качества, рентабельности и экологичности :
 - а. химический
 - б. химико-энзиматический
 - в. биологический
 - г. микробиологический
 - д. верно все
3. Выберите аминокислоту, производство которой наиболее рационально химико-энзиматическим методом:
 - а. глицин
 - б. метионин
 - в. фенилаланин
 - г. треонин
 - д. лизин
4. В интактной клетке *Escherichia coli* избыток треонина на уровне молекулярной регуляции клеточного метаболизма действует:
 - а. как ингибитор активности аспартакиназы - конечного фермента своего биосинтетического пути
 - б. как активатор аспартакиназы - начального фермента своего биосинтетического пути
 - в. в контакте с активным центром фермента
 - г. в контакте с аллостерическим центром фермента - изменяет конформацию фермента, снижая его каталитическую активность
 - д. в контакте с аллостерическим центром фермента без изменения конформации фермента, не снижая его каталитическую активность
5. Рабочий цикл ферментации аминокислот зависит от:
 - а. от «фоновой» концентрации источников углерода
 - б. продуктивности биомассы
 - в. использования субстрата
 - г. наличия в среде токсических метаболитов
 - д. верно все

Вариант 3

1. Какой препарат на основе аминокислот используется как регулятор процессов регенерации в головном мозге (инсульт, ишемия)?
 - а. церебролизин
 - б. цистеин
 - в. метионин
 - г. глицин
 - д. аланин
2. Для какой аминокислоты, химический синтез является более рациональным, чем микробиологический?
 - а. лейцин
 - б. изолейцин
 - в. глицин
 - г. фенилаланин
 - д. лизин
3. Что отличает ауксотрофы от гетеротрофов в процессе биосинтеза аминокислот?
 - а. активизация клеточного метаболизма аминокислот
 - в. стабилизация клеточного метаболизма аминокислот
 - г. низкая активность ферментов
 - г. высокая активность внутриклеточных протеиназ
 - д. способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты
4. Причиной включения механизма репрессии при регуляции биосинтеза аминокислот в клетке *Escherichia coli* является:
 - а. наличие избыточного количества треонина в клетке
 - б. превращение части треонина в изолейцин
 - в. накопление треонина и изолейцина одновременно
 - г. взаимодействие треонина с аттенуатором и терминация процесса транскрипции белка фермента
 - д. верно все
5. Использование генной инженерии в получении штамма-суперпродуцента треонина дает следующие преимущества:
 - а. упрощения методики
 - б. удешевление производства
 - в. отсутствие катализаторов
 - г. сокращение времени производства
 - д. повышение продуктивности биомассы

Вариант 4

1. Какой из ниже представленных можно отнести к космоцетическим препаратам на основе аминокислот:
 - а. глицин
 - б. метионин
 - в. эмбриобласт
 - г. румалон
 - д. раверон
2. Выберите биообъект для биотехнологического производства треонина:
 - а. *Bacillus subtilis*
 - б. *Escherichia coli*

- в. *Corynebacterium glutamicum*
 - г. *Xanthomonas* sp.
 - д. *Pseudomonas* sp.
3. Регуляция и управление метаболическими процессами в клетке *Corynebacterium glutamicum* представлены механизмами:
- а. прямой связи
 - б. косвенной связи
 - в. ретроингибирования
 - г. репрессии
 - д. активации
4. Штамм-суперпродуцент *Corynebacterium glutamicum* характеризуется:
- а. низкой активностью внутриклеточных протеиназ
 - б. активным метаболизмом
 - в. лабильностью белков-ферментов
 - г. дезактивацией белков-ферментов
 - д. нарушением системы внутриклеточной регуляции
5. В процессе ферментации при производстве треонина необходимо поддерживать оптимальные значения рН среды, что делается:
- а. смесью солей аммиака
 - б. смесью основания аммиака с солями аммиака
 - в. смесью углеводов
 - г. смесью аммиачной воды и углеводов
 - д. смесью аммиака и углеводов

Вариант 5

1. Выберите биообъект для биотехнологического производства лизина:
- а. *Bacillus subtilis*
 - б. *Escherichia coli*
 - в. *Corynebacterium glutamicum*
 - г. *Xanthomonas* sp.
 - д. *Pseudomonas* sp.
2. К семейству аспарагиновой кислоты относится триада аминокислот:
- а. треонин, лизин, метионин
 - б. треонин, глицин, лизин
 - в. лизин, изолейцин, метионин
 - г. гомосерин, изолейцин, метионин
 - д. гомосерин, лизин, метионин
3. Синтез каждой аминокислоты в клетке на уровне молекулярной регуляции осуществляется посредством изменения:
- а. количества ферментов
 - б. структуры фермента
 - в. структурных белков
 - г. синтеза белков ферментов соответствующим геном
 - д. аттенуатора
4. Ферментация в эффективном производстве аминокислот должна проводиться в условиях:
- а. добавления предшественников
 - б. интенсивной аэрации

- в. активного перемешивания
 - г. дробной подачи компонентов питательной среды
 - д. верно все
5. Синтез целевой аминокислоты может прекратиться из-за воздействия на продуцент:
- а. токсических метаболитов биосинтеза в клетке
 - б. изменения кислотности среды (pH)
 - в. отсутствия ростовых факторов
 - г. недостаточности процесса аэрации
 - д. верно все

Примечание: если студент пропускает 1-ое занятие - входной контроль заменяется на многотестовый контроль с последующей выдачей ситуационной задачи (при положительной оценке этих вопросов преподавателем).

1.3.2. Интерактивный формат контакта преподавателя и студентов с предложением списка вопросов (1-2 мин).

Списки вопросов находятся на руках студентов. Каждый студент задает вопрос другому студенту. В случае затруднений с ответом, на данный вопрос может отвечать любой другой студент. Ответ оценивается преподавателем и вносится в сумму общей оценки по предложенной теме.

1. Биологическая роль аминокислот.
2. Аминокислотный состав суммарного белка.
3. Связь синтеза белка с количественным соотношением аминокислот.
4. Отрасли применения аминокислот.
5. Цели применения аминокислот в сельском хозяйстве.
6. Цели применения аминокислот в пищевой промышленности.
7. Цели применения аминокислот в медицине.
8. Влияние аминокислот на обменный процесс в организме.
9. Цели применения препаратов на основе аминокислот для парентерального питания.
10. Применение аминокислот в качестве космоцевтических препаратов.
11. Методы получения чистых аминокислот.
12. Сущность биологического способа получения аминокислот.
13. Сущность химического способа получения аминокислот.
14. Сущность химико-энзиматического способа получения аминокислот.
15. Сущность микробиологического способа получения аминокислот.
16. Недостатки использования химического производства аминокислот по сравнению с микробиологическим.
17. Положительные и отрицательные факторы химико-энзиматического метода получения аминокислот.
18. Примеры наиболее часто используемых биообъектов как штаммов продуцентов аминокислот.
19. Преимущества использования кишечной палочки в качестве продуцента аминокислот.

20. Основания для использования микроорганизмов при прямом микробиологическом синтезе аминокислот.
21. Что такое гетеротрофные бактерии?
22. Что представляют собой мутанты-ауксотрофы?
23. Способы получения мутантов-ауксотрофов.
24. Принцип получения суперпродуцента при биосинтезе аминокислот.
25. Механизмы регуляции биосинтеза по принципу обратной связи.
26. Аттенуатор и принцип его работы.
27. Репрессия на примере биосинтеза треонина.
28. Что характерно для фермента аспартакиназы в биосинтезе аминокислот?
29. Понятие низкомолекулярного эффектора.
30. Что отличает коринебактерии от энтеробактерий?
31. В чем различие между ростом биомассы и биосинтезом целевой аминокислоты у кишечной палочки и коринебактерий?
32. Необходимые условия биотехнологического получения аминокислот.
33. Условия накопления высокого уровня аминокислот.
34. Что определяет необходимость рН-статирования при биосинтезе аминокислот?
35. Ростовые факторы и их влияние на штамм, синтезирующий аминокислоту.
36. Что определяет необходимость аэробных условий ферментации при получении аминокислот?
37. Методы продления активности штаммов-продуцентов.
38. Появление возможности синтеза токсических метаболитов и прекращения синтеза целевой аминокислоты.
39. Как избежать накопления побочных примесей при биосинтезе фенилаланина?
40. Возможности генной инженерии в повышении качества конечного продукта (аминокислоты) и увеличения его выхода (повышения рентабельности и удешевления производства).

1.3.3. Варианты ситуационных задач по биотехнологии аминокислот и препаратов на их основе в соответствии с требованиями фармацевтического рынка.

Студенты в каждой задаче должны найти проблемы и предложить способы их решения с аргументированным обоснованием.

Задача 1.

Обоснование актуальности развития производства аминокислот в современных условиях.

Задача 2.

Пути биосинтеза и методы селекции продуцентов отдельных аминокислот.

Задача 3.

Проведите сравнительный анализ методов получения аминокислот, отметив их позитивные и негативные стороны.

Задача 4.

Возможности использования микробиологического синтеза в производстве аминокислот и препаратов на их основе для медицинских целей с последующей его реализацией в производственных масштабах.

Задача 5

Принципы преобразования микроорганизмов для получения активных штаммов для промышленного использования. Примеры.

Задача 6

Конструирование штаммов-суперпродуцентов аминокислот. Особенности их культивирования.

Задача 7

Подготовительные стадии организации производства аминокислот. Проблемы стерилизации питательных сред, технологического оборудования и коммуникаций.

Задача 8.

Определите проблемы культивирования продуцента и биосинтеза лизина в промышленных ферментерах.

Задача 9.

При каких условиях осуществляется сверхсинтез лизина и треонина. Как можно оптимизировать процесс накопления этих аминокислот в ферментационном процессе?

Задача 10.

Определите технологические рекомендации по продлению активности работы продуцентов лизина и треонина. В каком случае может произойти прекращение образования (накопления) аминокислот?

Задача 11.

Как можно эффективно использовать субстрат при биосинтезе целевой аминокислоты? Приведите пример.

Задача 12.

Какой тип ферментации в классификации по материальным потокам является оптимальным в случае получения аминокислот? Приведите ваши обоснования на конкретном примере.

Задача 13.

Определите возможности организации сверхсинтеза треонина в промышленных масштабах.

Задача 14.

Роль аттенуатора и фермента аспартокиназы при создании суперпродуцента треонина.

Задача 15.

При каких условиях возможен сверхсинтез треонина в промышленных масштабах?

Задача 16.

Каким образом можно обеспечить сверхсинтез лизина, используя схему биосинтеза лизина у коринебактерий?

Задача 17.

Приведите технологические рекомендации по оптимизации ведения процесса культивирования продуцентов -ауксотрофов при получении лизина в промышленных объемах.

Задача 18.

Приведите технологические рекомендации по организации и ведению процесса с высоким уровнем образования аминокислот (соответствующим промышленным объемам).

Задача 19.

Приведите технологические рекомендации по предупреждению накопления побочных продуктов, снижающих качество получаемой аминокислоты на примере фенилаланина.

Задача 20.

Возможности оптимизации и совершенствования биотехнологии по повышению продуктивности биомассы и использования субстрата при получении аминокислот в промышленных масштабах.

1.3.4. Рекомендуемая форма протокола по решению практических задач по курсу биотехнологии

1. Название темы

- 1.1. Сущность вопроса.
- 1.2. Актуальность темы.
- 1.3. Анализ существующих проблем.

2. Целевые задачи по решению проблем в части:

2.1. Специфика ресурсов биотехнологического производства ЛС и БАВ.

- 2.1.1. поиск и отбор биообъектов (скрининг)
- 2.1.2. требования производства к промышленному штамму
- 2.1.3. возможности получения промышленного штамма в лаборатории
- 2.1.4. возможности идентификации продуцентов
- 2.1.5. проблемы хранения продуцентов

2.2. Особенности биотехнологического процесса (биосинтеза или биокатализа) в промышленном производстве ЛС.

- 2.2.1. подготовительные стадии биосинтеза или биокатализа
- 2.2.2. основные стадии биосинтеза или биокатализа
- 2.2.3. режимы ферментационных процессов в сравнительном анализе
- 2.2.4. управления ферментационными процессами

**2.3. Оценка качества и количества конечного продукта
(рентабельность)**

**2.4. Возможности повышения качества целевого продукта и
рентабельности биотехнологического производства.**

Заключение (выводы) в формате резюме.

**Представленные задачи рассматриваются, как проблематика биотехнологического процесса получения ферментных препаратов на производстве. Выдаются каждому студенту на внеаудиторную самостоятельную работу в конце первого лекционно-семинарского занятия для подготовки к защите полученного задания на втором занятии. Протокол ответа по выданной преподавателем на первом занятии задаче должен содержать: цель, задачи, проблемы и их решение с аргументацией выбора. Можно использовать схемы, рисунки, графики.*

1.3.5. Рекомендуемый формат рабочей тетради по написанию протокола студентами

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.
Сеченова (Сеченовский Университет)
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАРК БИОМЕДИЦИНЫ
ИНСТИТУТ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Кафедра биотехнологии

**Рабочая тетрадь по теме: Аминокислоты как лекарственные средства
биотехнологического производства**

Выполнил -----

Преподаватель -----

1.3.6. Контрольные вопросы для защиты темы «Аминокислоты как лекарственные средства биотехнологического производства»

1. Моно- и комплексные лекарственные препараты на основе аминокислот по действию и применению.
2. Актуальность производства аминокислот и методы их получения в сравнительной характеристике.
3. Пути биосинтеза и методы селекции продуцентов аминокислот как ресурс биотехнологии аминокислот.
4. Механизмы регуляции и управления метаболическими процессами на уровне ретроингибирования и репрессии в клетках бактерий.

5. Специфика ферментационного процесса при получении лизина.
Контроль и управление процессом.
6. Специфика ферментационного процесса при получении треонина.
Контроль и управление процессом.
7. Подготовительные и основные стадии биосинтеза аминокислот.
8. Проблема прекращения биосинтеза целевой аминокислоты и соответствующие решения.
9. Возможности генетической инженерии в повышении эффективности использования субстрата и повышения качества продукта.
10. Контроль и управление процессом биосинтеза целевой аминокислоты на примере треонина.

1.4. Рекомендуемые информационные материалы

Лекция «Биотехнология аминокислот»

План

1. Методы получения аминокислот
2. Механизмы регуляции биосинтеза аминокислот
 - 2.1. Биосинтез лизина
 - 2.2. Биосинтез треонина
3. Особенности культивирования штаммов-продуцентов
 - 3.1. Особенности питательной среды
 - 3.2. Условия ферментации аминокислот
 - 3.3. Применение генной инженерии

Аминокислоты являются составными элементами белков. Все 20 аминокислот являются мономерами для построения природных полипептидов и хорошо изучены (методы их синтеза подробно описаны). Известно также, что эти соединения существуют в виде оптических изомеров (теория строения органических соединений Бутлерова А.М., открывшего асимметрию атома углерода с четырьмя заместителями, определяющими направление и степень вращения плоскости поляризованного света).

Современные методы органического синтеза позволяют синтезировать L- и D-формы аминокислот, но только как рацематы, дальнейшее разделение которых представляет трудную задачу и экономически не эффективно.

Другой способ получения аминокислот - это микробиологический синтез, когда используют штаммы-продуценты, осуществляющие сверхсинтез аминокислот. Избыточные количества аминокислот, например, L-лизина, L-глутаминовой кислоты, L-треонина, L-триптофана экскретируются (выходят) в культуральную (внешнюю) среду. Культуральная среда в этом случае может содержать от четырех, пяти и до ста граммов целевой аминокислоты на один литр жидкой фазы. В отличие от химического синтеза, в этом случае, то есть при биосинтезе аминокислот с помощью ферментных систем микроорганизмов, получаются исключительно L-формы аминокислот, обуславливающие терапевтический эффект, а не рацематы. Это обстоятельство решает проблему

выбора получения аминокислот в промышленном масштабе в пользу биотехнологических методов.

Сегодня известны 4 метода получения аминокислот:

1. химический (тонкий органический синтез)
2. химико-энзиматический (энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием биологически активных L-изомеров). Метод достаточно дорогой.
3. биологический (применение гидролиза белок-содержащих субстратов)
4. прямой микробиологический (получение чистых L-аминокислот). Метод более дешевый, экономически выгодный.

Наиболее распространенными методами получения аминокислот являются химико-энзиматический и микробиологический.

В качестве примеров использования химико-энзиматического метода можно привести:

- синтез аспарагиновой кислоты из фумаровой (используются клетки *Escherichia coli*)
- синтез L-фенилаланина из коричной кислоты (используются клетки дрожжей).

Ставя задачу получения аминокислот, используя природные микроорганизмы, надо помнить о механизмах регуляции биосинтеза по принципу обратной связи (ретроингибирование). Эта регуляция осуществляется либо за счет ингибирования активности одного из начальных ферментов собственного синтеза избыточным продуктом, то есть самой аминокислотой, либо репрессируется весь комплекс ферментов всей биохимической цепочки метаболизма клетки, что является естественной реакцией живого микроорганизма-производителя для сохранения собственного равновесия на клеточном уровне. Таким образом, перед биотехнологом стоит задача в нарушении этих механизмов, чтобы иметь возможность получить целевой продукт в необходимых количествах.

Как это делается, можно рассмотреть на примере продуцентов лизина (*Corynebacterium glutamicum*) и треонина (*Escherichia coli*).

У *Corynebacterium glutamicum* есть принцип согласованного ингибирования ферментативной активности, что является особенностью биосинтеза биосинтеза предшественника лизина. Ингибирование синтеза лизина в клетке возможно только при повышенной концентрации обеих конечных продуктов - лизина и треонина. Самостоятельно ни лизин, ни треонин не ингибируют активности ключевого фермента - аспартакиназы. Они ингибируют этот синтез только вместе. Таким образом, вызвать сверхсинтез лизина можно лишь нарушив синтез треонина или его предшественника - гомосерина. Действительно, большинство продуцентов лизина не способны синтезировать гомосерин или треонин, то есть являются «ауксотрофами» по этим аминокислотам.

Таким образом, большинство продуцентов лизина нуждается в присутствии гомосерина или треонина, иначе они работать не будут. Зная это, биотехнолог, выращивая такие продуценты, должен обязательно вносить в питательную среду от половины до полутора граммов на один литр гомосерина или треонина. В этом случае происходит активный рост биомассы продуцента без синтеза лизина. Как только треонин исчезает из среды и рост биомассы прекращается,

начинается активный синтез лизина. Таким образом, данный процесс имеет две стадии развития

1. рост биомассы
2. синтез лизина

Продолжительность синтеза составляет 2-3 суток. Уровень накопления продукта составляет 50-100 граммов на литр. Это особенности биосинтеза лизина.

Второй пример. Синтез треонина.

Особенности регуляции биосинтеза треонина в клетках *Escherichia coli* (кишечной палочки). В этом случае ситуация другая. У кишечной палочки нет механизма согласованного ингибирования ферментативной активности, то есть, если лизин ингибирует активность своих ферментов по принципу обратной связи, то треонин - своих ферментов. Кроме того, имеет место «репрессия» всего комплекса треониновых ферментов при избытке треонина или изолейцина и это похоже на «согласованную репрессию». Самостоятельно (по отдельности) ни треонин, ни изолейцин не репрессируют синтез ферментов. Для решения задачи получения треонина в необходимых количествах пришлось сделать следующее:

1. изменить, сделать нечувствительным к треонину первый фермент пути биосинтеза треонина
2. снизить активность фермента, синтезирующего из треонина изолейцин
3. убрать механизм репрессии при недостаточном количестве изолейцина, несмотря на избыток треонина
4. применить генную инженерию (выделить треониновые гены и размножить их на плазмидах в клетке микроорганизма, резко повысить синтез треонина клетками продуцента)

В рассматриваемом случае синтез треонина отличается от синтеза лизина тем, что его синтез происходит одновременно с ростом биомассы. Здесь уже нет двух стадий.

Особенности культивирования штаммов-продуцентов аминокислот приводят к следующему результату:

1. достигается максимально высокая скорость синтеза аминокислот клетками продуцента
2. достигается максимальная длительность работы продуцента
3. минимально образуются побочные продукты биосинтеза аминокислот.

Первая задача решается путем выращивания высокоактивной биомассы и помогает в этом случае наличие в питательной среде: источников углерода, аммонийного азота, минеральных солей, ростовых факторов; оптимизация рН (кислотность среды), температуры; дробная подача субстратов.

Для предотвращения закисления среды проводят автоматическое рН-статирование аммиачной водой и источниками углерода.

В случае биосинтеза лизина добавляют ростовые факторы по мере необходимости, что зависит от самого сырья, аппаратуры, температуры. Процесс биосинтеза энергоемкий и требует интенсивной аэрации и перемешивания.

Для длительной работы ауксотрофных продуцентов лизина в питательную среду вносят комплексный источник аминокислот (белковые гидролизаты).

Синтез нужной аминокислоты может прекращаться, если на ее продуцент действуют его токсические метаболиты, которые синтезируются самим

продуцентом. Например, в процессе биосинтеза фенилаланина, продуцентом которого является *Bacillus subtilis*, этот продуцент синтезирует примеси ацетоина и бутандиола, в результате этого клетки продуцента лизируются, образуют споры и прекращают вырабатывать фенилаланин. Чтобы избежать этого, необходимо ферментацию вести в условиях лимита (ограничения) по источнику углерода. В этом случае весь сахар расходуется только на синтез фенилаланина, увеличивая как количество (в два раза), так и чистоту получаемого продукта.

В заключение можно сказать, что эффективность использования субстрата при биосинтезе аминокислот зависит от продуктивности биомассы.

Если синтез аминокислот разобщен с ростом биомассы (см. лизин), то эффективность использования субстрата будет тем выше, чем дольше будет работать культура после остановки роста. Если же синтез аминокислоты идет параллельно росту биомассы (см. треонин), то эффективность биомассы можно увеличить, добавляя определенное количество предшественников.

Наиболее перспективным направлением повышения эффективности использования субстрата и повышения качества конечного продукта являются методы генетической инженерии - введение в клетку продуцента многокопийных плазмид, содержащих гены, контролирующие биосинтез аминокислот в ущерб синтезу биомассы и других клеточных компонентов. С помощью гибридных плазмид в биосинтезе аминокислот мы получаем:

1. рост продуктивности биомассы
2. исчезновение примесей (более чистый продукт)
3. возрастает коэффициент использования субстрата (его минимум дает максимум продукта).

1.5. Терминологическая идентификация ключевых понятий по биотехнологии аминокислот.

Для повышения качества получаемых знаний и умений также можно использовать тренинг по свободному владению терминами, определяющими специфику данной темы.

Расшифруйте ниже представленные термины:

1. Аминокислоты, как химические соединения.
2. Аминокислоты, как биологические соединения.
3. Изомерия аминокислот.
4. Суммарный состав белка по аминокислотам.
5. Космоцевтические медицинские препараты.
6. Биообъекты для получения аминокислот.
7. Гетеротрофы.
8. Ауксотрофы.
9. Принцип обратной связи.
10. Ретроингибирование.
11. Репрессия.
12. Аминокислоты семейства аспарагиновой кислоты.
13. Киназы.
14. Аспартокиназа.
15. Промотор.

16. Оперон.
17. Транскрипция.
18. Трансляция.
19. Терминация.
20. Аттенуатор.
21. Низкомолекулярный эффектор.
22. Коринобактерии (*Corynebacterium glutamicum*) в биотехнологии получения аминокислот.
23. Кишечная палочка (*Escherichia coli*) в биотехнологии получения аминокислот.
24. Субстрат для биосинтеза аминокислот.
25. Дробная подача субстратов.
26. pH-стабилизация.
27. Ростовые факторы.
28. «Фоновая» концентрация источника углерода.
29. Многокопийные гибридные плазмиды.
30. Система «вакуумного насоса».

2. Ферменты как лекарственные препараты биотехнологического производства, инженерная энзимология

2.1. Введение

Материалы практикума необходимы для формирования у студентов четких алгоритмов по выбору определенных звеньев технологического процесса, определяющих его максимальную эффективность.

Тема «Ферменты как лекарственные препараты биотехнологического производства, инженерная энзимология» посвящена биотехнологическим методам получения данных лекарственных препаратов. Представленный материал включает характеристики основных промышленных штаммов-продуцентов, особенности питательных сред, а также параметры их культивирования. На конкретных примерах показаны методы выделения, очистки и определения количественного содержания целевых продуктов. Подчеркивается преимущество использования биотехнологических методов в промышленном производстве ферментов - создание перспективных малоотходных технологий получения ЛС.

Цель изучения темы: ознакомление студентов с биотехнологическими этапами, используемыми в фармацевтической промышленности для получения различных ферментных, а также использование последних в качестве биокатализаторов при промышленном получении аскорбиновой кислоты и убихинонов, в частности убихинона 10.

2.2. Проведение практических занятий

Изучение темы распределено на 2 занятия.

NB! Студенты должны иметь предварительную информацию по подготовке к данной теме (обучающий диск, учебник и руководство к практическим занятиям, а также лекции)

Первое занятие строится следующим образом (хронокарта 1)

- | | |
|---|---------|
| 8. Введение (название темы, актуальность, проблемы качества и рентабельности производства) | 30 мин. |
| 9. Входной контроль по блиц-тестам (5 вопросов) | 10 мин. |
| 10. Раздача ситуационных задач (по выбору преподавателя) и дополнительных учебных материалов (пособие № 5,7,8) | 5 мин. |
| 11. Рекомендации преподавателя по работе с информационным материалом | 25 мин. |
| 12. Перерыв | 15 мин. |
| 13. Самостоятельная работа студента (это часть аудиторной работы проводится под консультативном руководством преподавателя, а её завершение - остается в качестве самостоятельной работы вне аудитории для каждого студента в группе) | |

мин.

14. Подведение итогов занятия с отметкой в журнале, сбор методических материалов

.....10

мин. _____

Пояснения к занятию.

- а). В случае отсутствия студента на занятии, входной тест заменяется в дальнейшем на вопросы входного контроля на отработках (прилагаются).
- б). В случае отрицательного результата по тесту при подписании успешно выполненной работы студенту предлагаются 2-3 дополнительных вопроса по теме (могут быть вопросы из входного контроля).
- в). Задачи раздаются по выбору преподавателя.

Второе занятие включает общий объем времени 2 часа 35 мин. с перерывом 15 мин. Студент приходит на занятие с подробным протоколом решения поставленных задач и технологическим обоснованием (все записи должны быть представлены в тетради с обозначением ФИО и № группы на обложке для регистрации выполнения задания и подписи преподавателя в случае положительной оценки работы).

Занятие строится следующим образом (хронокарта - 2)

- 6. Проверка готовности к защите представленной работы (наличие подробного конспекта, графики, рисунки, комментарий в аспекте поставленных задач и решений)
15 мин.
- 7. Защита работы: каждому студенту дается около 8 мин. на устное выступление с планом защиты (по выбору преподавателя - 5 студентов из группы) 50 мин.
- 8. Перерыв 15 мин.
- 9. Продолжение защиты работ (5 студентов из группы по выбору преподавателя)50 мин.
- 10. Подписание работ с отметкой в журнале* (для студентов, которые не выступали с устным докладом). Объявление новой темы следующего занятия для домашней подготовки (диск, учебник, руководство к практическим занятиям по фармацевтической биотехнологии, лекции)25 мин.

**Для подписания работы студенту необходимо предоставить правильно оформленную рабочую тетрадь (более подробно - см. ниже) и расширенный протокол ответа по выданной преподавателем задаче. При этом студент должен быть готовым ответить на любой вопрос по теме занятия, включая контрольные вопросы и рабочую тетрадь.*

2.3. Оценочные средства

2.3.1. Входной контроль по теме «Ферменты как лекарственные препараты биотехнологического производства, инженерная энзимология» (допускается только один правильный ответ*)

1. Определите холофермент, если это молекулярный комплекс:

- а. белковой части
- б. белковой части и кофактора
- в. сложного органического соединения
- г. коферментов
- д. неорганических кофакторов

2. Укажите окислительно-восстановительные биокатализаторы:

- а. оксиредуктазы
- б. трансферазы
- в. гидролазы
- г. лиазы
- д. изомеразы

3. Промышленный биокатализатор - это:

- а. изолированный фермент
- б. изолированный фермент и коэнзим
- в. иммобилизованный фермент
- г. пермеабиллизированная клетка
- д. интактная клетка

4. Изолированный фермент характеризуется тем, что:

- а. имеет защиту системами клеточного гомеостаза
- б. теряет защиту системами клеточного гомеостаза
- в. усиливает защиту системами клеточного гомеостаза
- г. не снижает каталитической активности
- д. не снижает субстратную специфичность

5. Укажите фибринолитический фермент микробиологического синтеза, эффективный при лечении тромбозов:

- а. стрептокиназа
- б. α -амилаза
- в. солизим
- г. галактозидаза
- д. трипсин

6. Определите апофермент, если это молекулярный комплекс:

- а. белковой части
- б. белковой части и кофактора
- в. белковой части и сложного органического соединения
- г. коферментов
- д. ионов металлов

7. Укажите биокатализаторы гидролиза:

- а. оксиредуктазы
- б. трансферазы
- в. гидролазы
- г. лиазы
- д. изомеразы

15. Укажите сахаролитический фермент микробиологического синтеза, применяемого в составе препарата «Фестал» при недостаточной функции поджелудочной железы:

- а. стрептокиназа
- б. α -амилаза
- в. солизим
- г. галактозидаза
- д. трипсин

16. Изолированный фермент отличается:

- а. сохранением каталитической активности
- б. потерей каталитической активности
- в. сохранением субстратной специфичности
- г. сохранением реакционной специфичности
- д. защитой системами клеточного гомеостаза

17. Биообъект иммобилизуется на носителе методами:

- а. сорбции
- б. десорбции
- в. адсорбции
- г. комплексообразования
- д. экстракции

11. Укажите ферменты, участвующие в реакциях переноса отдельных групп с одной молекулы на другую:

- а. оксиредуктазы
- б. трансферазы
- в. гидролазы
- г. лиазы
- д. изомеразы

12. Укажите липолитический фермент микробиологического синтеза, применяемый в терапии при хронических заболеваниях ЖКТ:

- а. стрептокиназа
- б. α -амилаза
- в. солизим
- г. галактозидаза
- д. трипсин

13. Изолированный фермент отличается:

- а. стабильностью
- б. лабильностью
- в. нечувствительностью к рН
- г. нечувствительностью к температуре
- д. нечувствительностью к любым физико-химическим изменениям среды

14. Иммобилизация биообъекта - это:

- а. физическое разделение биокатализатора и субстрата
- б. физическое соединение биокатализатора и субстрата
- в. химическое разделение биокатализатора и субстрата
- г. химическое соединение биокатализатора и субстрата
- д. химическая активация биокатализатора

15. При ковалентном связывании ферментов используют носители:

- а. только природные с предварительной активацией

- б. только синтетические с предварительной активацией
- в. природные и синтетические без предварительной активации
- г. природные и синтетические с предварительной активацией
- д. верно все

16. Микробиологическим синтезом для медицинских целей получают сахаролитический фермент, используемый при лечении лактазной недостаточности:

- а. стрептокиназу
- б. галактозидазу
- в. урокиназу
- г. α -амилазу
- д. пепсин

17. Укажите ферменты, участвующие в реакциях соединения или расщепления молекул:

- а. оксиредуктазы
- б. трансферазы
- в. гидролазы
- г. лиазы
- д. изомеразы

18. Пермеабилizированная клетка характеризуется повышенной:

- а. устойчивостью
- б. реакционной способностью
- в. специфичностью
- г. проницаемостью
- д. подвижностью

19. Биообъект иммобилизуют на носителе методами, позволяющими образовать:

- а. гидратные комплексы
- б. хелатные комплексы
- в. малорастворимые соединения
- г. ковалентные связи
- д. водородные связи.

20. Для выделения фермента на заключительных этапах при избирательном взаимодействии фермента и адсорбента используют:

- а. центрифугирование
- б. осаждение солями металлов
- в. фильтрацию
- г. афинную хроматографию
- д. газожидкостную хроматографию

Примечание: если студент пропускает 1-ое занятие - входной контроль заменяется на многотестовый контроль с последующей выдачей ситуационной задачи (при положительной оценке этих вопросов преподавателем).

2.3.2. Интерактивный формат контакта преподавателя и студентов с предложением списка вопросов и коротких ответов по изучаемой теме (1-2 мин).

Списки вопросов находятся на руках студентов. Каждый студент задает вопрос другому студенту. В случае затруднений с ответом, на данный вопрос может

отвечать любой другой студент. Ответ оценивается преподавателем и вносится в сумму общей оценки по предложенной теме.

1. Ваше представление о ферментах и классификации ферментных реакций.
2. На чем основаны ограничения использования ферментов в биотехнологии?
3. Ваше представление о значении иммобилизации ферментов?
4. Представьте доказательства преимущества использования иммобилизованных ферментов.
5. Представьте методы иммобилизации ферментов.
6. Что можно предложить в качестве органических носителей ферментов при их иммобилизации?
7. Что можно предложить для снятия ограничений в технологии использования ферментов?
8. Что можно предложить в качестве носителей неорганической природы при проведении иммобилизации ферментов?
9. Ваше представление об инкапсулировании.
10. Какие природные материалы могут быть предложены при ковалентном присоединении молекул ферментов к водонерастворимому носителю?
11. Предложите пути оптимизации процесса производства ферментов.
12. Преимущества использования гидролитических ферментов.
13. Особенности получения биокатализатора в зависимости от локализации целевого продукта.
14. Ферменты, используемые при получении антибиотиков.
15. Как можно избежать получения рацематов при производстве аминокислот?
16. Какие проблемы вызывают коферменты и кофакторы в биотехнологическом производстве?
17. Назовите промышленные биокатализаторы.
18. Преимущества использования иммобилизованных клеток микроорганизма в производстве б АПК.
19. Приведите примеры микробиологического синтеза ферментных препаратов для медицинских целей.
20. Основные направления использования ферментов в медицине.
21. Примеры использования ферментов в качестве лекарственных средств.
22. Примеры продуцентов для получения ферментов.
23. Оптимальный вариант работы биообъекта с учетом требований производства при полном биосинтезе целевого продукта.
24. Технологическая операция, осуществляемая очищенным ферментом.
25. Какую технологическую операцию осуществляет интактная клетка с полной функциональной активностью клетки-продуцента?
26. Определите технологическую операцию «системы, открытой для усложнения».
27. На чем основано действие ферментов как промышленных биокатализаторов?
28. Коротко - о возможности совершенствования технологического процесса получения лекарственных веществ с использованием ферментов.
29. Преимущества биокатализа в тонком органическом синтезе.
30. Что необходимо сделать для осуществления биокаталитического процесса?

2.3.3. Задачи для выдачи студентам*

Задача 1.

Обоснование актуальности развития производства ферментов для современного фармацевтического рынка. Понятие микробиологического синтеза в производстве ферментных препаратов для медицинских целей и его реализация в производственных масштабах.

Задача 2.

Определите возможности ресурсов (источников) для их использования, как проблемы культивирования микроорганизмов и получения промышленного штамма для биотехнологического производства.

Задача 3.

Аппаратурное обеспечение биотехнологического производства ферментов. Меры безопасности при работе с культурами микроорганизмов на производстве.

Задача 4.

Определите специфику организации асептических условий производства ферментов, включая подготовительные этапы.

Задача 5.

Свойства ферментов, влияющие на организацию их производства. Специфика биосинтеза ферментов.

Задача 6.

Приведите технологические рекомендации по предварительным стадиям работы с культурами микроорганизмов для реализации ферментационного процесса в производстве ферментов.

Задача 7.

Определите выбор режима ферментации в производственном процессе получения ферментов с учетом типа ферментации и получения конечного продукта.

Задача 8.

Охарактеризуйте проблематику ферментационного процесса при получении ферментов с учетом аппаратного оформления, питательных сред и управления процессом.

Задача 9.

Технологические рекомендации по выделению и очистке получаемых ферментов как целевых продуктов процесса с последующей оценкой их качества.

Задача 10.

Приведите технологические решения по повышению эффективности и качества производства ферментов.

Задача 11.

Охарактеризуйте проблемы применения физической иммобилизации в сравнительной характеристике с использованием адсорбции на нерастворимых носителях и включением в поры геля.

Задача 12.

Значение факторов, влияющих на адсорбцию ферментов на нерастворимом носителе и в гелях.

Задача 13.

Охарактеризуйте целесообразность использования биообъектов разных «типов» в соответствии с целевыми задачами производства ферментов.

Задача 14.

Проблема ограничений использования иммобилизации ферментов и пути решения.

Задача 15.

Проведите сравнительный анализ индивидуального фермента и клетки микроорганизма в оценке каталитической активности и возможности использования с позиций качества целевого продукта и рентабельности производства.

Задача 16.

Приведите возможности «системы, открытой для усложнения» в случае получения полусинтетических бета-лактамных антибиотиков на примере пенициллина.

Задача 17.

Приведите возможности «системы, открытой для усложнения» в случае получения полусинтетических бета-лактамных антибиотиков на примере цефалоспоринов.

Задача 18.

Решение проблемы химического деацилирования бензилпенициллина для масштабного производства полусинтетических пенициллинов с целью расширения их номенклатуры.

Задача 19.

Приведите схему получения иммобилизованной пенициллинацилазы (пенициллинамидазы) с учетом возможных методов иммобилизации.

Задача 20.

Использование иммобилизованных аминоксилат для трансформации биологически активных веществ на примере N-ациламиноокислот.

Задача 21.

Проблемы и решения биотехнологического производства ферментов в соответствии с востребованностью фармацевтического рынка.

**Представленные задачи рассматриваются, как проблематика биотехнологического процесса получения ферментных препаратов на производстве. Выдаются каждому студенту на внеаудиторную самостоятельную работу в конце первого лекционно-семинарского занятия для подготовки к защите полученного задания на втором занятии.*

2.3.4. Рекомендуемый формат рабочей тетради по написанию протокола студентами

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Институт фармации

Кафедра биотехнологии

Рабочая тетрадь по теме: Ферменты как лекарственные препараты биотехнологического производства, инженерная энзимология

Выполнил -----

Преподаватель -----

2.3.5. Теоретическая часть (в рамках внеаудиторной работы)

1. Ферменты в определении, структуре и свойствах.
2. Классификация ферментов как биокатализаторов.
3. Пример энзимопатологии при недостатке или полном отсутствии фермента фенилаланина-4-монооксигеназы.
4. Примеры энзимодиагностики по определению:
 - активности трансаминаз
 - лактатдегидрогеназного и креатинфосфокиназного теста (изоферментный спектр ЛДГ и КФК)
 - активности щелочной фосфатазы
5. Ферментные препараты в номенклатуре терапевтических средств.
6. Ферментные препараты для медицинских целей, полученные путем микробиологического синтеза.
7. Протеолитические ферментные препараты (протеазы).
 - 7.1. Класс сериновых или щелочных протеаз клеточные и внеклеточные протеиназы (специфика активного центра, влияние рН, источники для получения трипсина и химотрипсина, лекарственные формы, использование).
 - 7.2. Класс карбоксильных или кислых протеаз (структура, источники, специфический ингибиторы, роль рН для стабильности ферментов, использование).
 - 7.3. Класс тиолзависимых или цистеиновых протеаз (источники, специфика активного центра, ингибиторы, отличительная особенность ферментов этого класса, использование).
 - 7.4. Класс нейтральных или металлопротеаз (источники, особенность активного центра, влияние рН на эффективность, применение).
8. Особенности выделения ферментов с учетом их белковой природы в зависимости от их локализации. Оценка чистоты ферментных препаратов.
9. Краткая технологическая схема получения террилитина, стрептокиназы и липазы.

2.3.6. Контрольные вопросы для защиты темы «Ферменты как лекарственные препараты биотехнологического производства, инженерная энзимология»

1. Определите уникальные свойства ферментов.
2. Значение свойств ферментов в организации технологии их получения.
3. Проблемы количественного определения ферментов. Решения.
4. Определите разницу между стандартной единицей активности и активностью ферментного препарата.
5. Нормируемый показатель качества ферментного препарата в производственной практике.
6. Примеры ферментных препаратов в номенклатуре аптек и их применение.
7. Решение проблемы получения промышленных штаммов мутантов для производства ферментных препаратов.

8. Факторы, влияющие на биосинтез ферментов при культивировании продуцентов ферментов.
9. Методы культивирования продуцентов ферментов.
10. Подготовительные стадии для проведения ферментации.
11. Стадии получения посевного материала. Обоснование оптимального объема посевного материала для ферментационного процесса.
12. Методы стерилизации питательных сред.
13. Стерилизация воздуха при производстве ферментов.
14. Характеристика ферментационного процесса получения ферментов в условиях глубинного культивирования. Аппараты и режимы культивирования.
15. Отличия поверхностного метода культивирования продуцентов ферментов.
16. Проблемы получения очищенных ферментов (схема: экстракция, отделение твердой фазы, концентрирование, ультрафильтрация, осаждение органическими растворителями, высаливание, сорбционная очистка, сушка, стандартизация)

2.4. Рекомендуемые информационные материалы

Лекция «Биотехнология ферментов»

План

1. Ферменты
 - 1.1. Определение понятия ферменты
 - 1.2. Классификация ферментных реакций
 - 1.3. Ограничения применения ферментов в биотехнологии
2. Иммобилизация ферментов
 - 2.1. Определение иммобилизации
 - 2.2. Преимущества иммобилизованных ферментов
 - 2.3. Методы иммобилизации ферментов
 - 2.4. Иммобилизация клеток микроорганизмов
 - 2.5. Иммобилизация животных и растительных клеток
 - 2.6. Носители для иммобилизации ферментов и целых клеток
 - 2.7. Пути решения проблем иммобилизации ферментов и целых клеток
3. Сочетание функционирования биообъекта с технологической операцией (таблица)
4. Аппаратурное (аппаратное) оформление
 - 4.1. Типы биореакторов
5. Применение иммобилизованных биообъектов при создании лекарственных средств на примерах:
 - 5.1. Получения аминокислот
 - 5.2. Получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК)
6. Биокатализ
7. Схема получения иммобилизованной аминоксилазы
8. Примеры ферментных препаратов для медицинских целей

В основе современной инженерной энзимологии лежит применение иммобилизованных ферментов и ферментных систем. Вспомним природу самих ферментов.

Ферменты - это катализаторы биологического происхождения. Наиболее ценные свойства ферментов - это высокая активность и специфичность (селективность) действия. Живые организмы содержат сотни и тысячи ферментов, основная функция которых заключается в регуляции практически всех химических реакций, определяющих жизнедеятельность организма. Приведем классификацию ферментативных реакций:

1. окисление и восстановление
2. перенос функциональных групп от одних молекул на другие
3. гидролиз
4. реакции с участием двойных связей
5. изомеризация или структурные изменения в пределах одной молекулы
6. синтез сложных соединений (обычно с энергетическими затратами)

У ферментов сложное пространственное строение, включающее определенную комбинацию химических групп. Имеются сведения, что в природе обнаружено свыше трех тысяч разных специфических ферментов. Однако технологическое применение ферментов имеет ограничения по следующим причинам:

1. однократное использование
2. неустойчивость (лабильность ферментов при хранении)
3. большая затрата труда на очистку ферментов, что определяет высокую стоимость их производства

Сравнительно недавно (несколько десятков лет назад) четко определились пути преодоления этих трудностей. Эти пути связаны с получением иммобилизованных ферментов и иммобилизованных клеток микроорганизмов. Приведем определение иммобилизации.

Иммобилизация – физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, то есть биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты свободно обмениваются между биообъектом и растворителем.

Биообъект может работать в этом случае многократно (неделя, месяц). Другими словами можно сказать, что иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Преимущества иммобилизации биообъекта:

1. многократность использования ферментов и живых клеток в наиболее продуктивной фазе
2. снижение количества отходов производства
3. повышение качества целевого продукта (он менее загрязнен), более простое выделение целевого продукта (особенно важно для производства инъекционных лекарственных препаратов, когда в продукте мало белка – нет пирогенности и аллергенности)
4. биотехнологический процесс становится более стандартным, более предсказуемым
5. устойчивость к внешним воздействиям

Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы:

1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. К природным материалам относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, ионообменные смолы и так далее.
2. Захват фермента в сетку геля или полимера.
3. Ковалентная сшивка (сшивание) молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента.
4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах)
5. Микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5-300 микрон).

Такая ситуация приводит к совершенствованию технологических процессов.

В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов - их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции простой фильтрацией. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим, используя колонны или проточные аппараты с иммобилизованными ферментами.

В последнее время получило достаточно широкое распространение применение иммобилизованных клеток микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов. Преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с иммобилизованными ферментами заключается в том, что при их использовании отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов, которые обходятся производству значительно дороже в осуществлении полного технологического процесса. Ферменты в микроорганизме находятся в своем естественном окружении (они термостабильны, работают более длительно, сохраняют свои каталитические свойства достаточно долго, они не уступают иммобилизованным ферментам в свойствах гетерогенных биокатализаторов).

Иммобилизация целых клеток микроорганизмов проводится аналогично иммобилизации ферментов, предотвращая их размножение, увеличивая сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с необработанными клетками.

Носители - это вещества органической и неорганической природы.

Органические: желатин, фибрин, альгинат натрия, целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, ПААГ (полиакриламидный гель).

Неорганические: термический песок, активированный уголь, окись алюминия, бентонит.

Ограничения методов иммобилизации:

- Если целевой продукт не выходит в среду растворителя, а накапливается внутри клетки, то работать с иммобилизованным продуктом нет смысла.
- Ферменты тоже не всегда можно иммобилизовать, например, если у фермента есть кофермент, который с ним не прочно связан. Кофермент можно вводить в среду, но это не всегда бывает возможно в условиях производства.

Пути иммобилизации ферментов и целых клеток

1. Адсорбция на нерастворимом носителе (на окиси алюминия, угле, смолах, карбоксиметилцеллюлозе и др.)

Адсорбция имеет недостаток, так как связи (в основном ионные) могут быть недостаточно прочными и разрушаться под воздействием рН и других факторов, при этом биообъект снимается с носителя. В производстве используется редко.

2. Адсорбция на аффинном носителе (избирательная сорбция к определенной группе веществ)
3. Ковалентное связывание. Носитель активируют, например ПААГ активируют бромцианом или глутаровым альдегидом. Носитель не должен быть токсичным для биообъекта.

Максимальная нагрузка носителя - это максимальное количество фермента, которое может быть иммобилизовано на определенном количестве носителя. Чем она больше, тем лучше.

4. Включение биообъекта в носитель или инкапсулирование

Биообъект включается в ячейки геля, субстрат проникает в ячейки, а целевой продукт свободно выходит.

Сложности, возникающие при инкапсулировании.

Если биообъект - изолированный очищенный фермент, то для его включения в гель ячейки не должны быть слишком большими. Но, если ячейки слишком маленькие, то затруднен контакт с субстратом и необходимо подбирать условия, чтобы субстрат свободно проникал и свободно уходил целевой продукт. Если биообъект - клетки, то ячейки должны быть достаточно большими. Необходим достаточный доступ к клеткам кислорода и отведения углекислого газа.

Связь с гелем не очень прочная и биообъект может вымываться.

Таблица. Классификация иммобилизованных биообъектов

Биообъект	Технологическая операция
1. Очищенный фермент	Катализирует отдельную реакцию, одноступенчатая трансформация, биоконверсия
2. Фермент сохраняется в клетке с коферментом	Отдельная реакция
3. Фермент в пермеабилзированной клетке (в клетке, у которой повышена проницаемость)	Отдельная реакция
4. Интактная клетка с полной функциональной активностью (клетка-продуцент)	Цепь реакций - полный биосинтез целевого продукта
5. «Система, открытая для усложнения»	Биосинтез продукта и его трансформация в одном биореакторе

Аппаратное оформление. Типы биореакторов.

1. Реактор колоночного типа (используется для иммобилизованных ферментов). Если много носителя, то может замедляться ток растворителя.
2. Модифицированный реактор колоночного типа используется для иммобилизованных клеток. Вверху имеется сетка для сдерживания

вспучивания при прохождении газа, имеется клапан для выхода газообразных продуктов.

3. В реакторе имеется мешалка. Количество носителя уменьшается. Также иммобилизация ферментов широко используется:

2. при получении полусинтетических цефалоспоринов (цефалотин, цефазолин и др.)
3. для трансформации стероидов (например, гидрокортизон в преднизолон)
4. иммобилизованные клетки используются в биофильтрах для очистки сточных вод
5. для приготовления так называемых ферментных электродов - биологические тесты
6. в научных исследованиях представляет большой интерес применение метода иммобилизации вместе с методом клеточной инженерии.

Иммобилизация животных и растительных клеток.

Растительные и животные клетки более крупные, они более требовательны и капризны. Их можно иммобилизовать (есть жесткая клеточная стенка), но при этом необходимо производить аэрацию и поддерживать стерильность.

Животные клетки иммобилизовать трудно (они не имеют жесткой клеточной стенки, есть только цитоплазматическая мембрана). Иммобилизуют - путем мягкой иммобилизации (гликопротеиды сыворотки крови и белковые факторы свертывания позволяют связывать клетки с носителем, например, гликохолестерол). Иммобилизованные животные клетки активно применяются в иммуноферментном анализе.

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывают новые перспективы создания эффективных лекарственных средств

Ферменты, закрепленные на носителях или модифицированные полимерами, часто снижают свою антигенность из-за уменьшения доступности их для рецепторов иммунной системы. На принципах иммобилизации физиологически активных соединений базируется приготовление ферментных препаратов, обладающих повышенным терапевтическим эффектом.

Интересные возможности были обнаружены при использовании ферментов для повышения чувствительности иммунохимических методов анализа. Суть любого иммунохимического анализа в том, что после завершения реакции антиген-антитело определить концентрацию избыточного компонента (антигена или антитела), не вступившего в реакцию. Поскольку эти концентрации очень невысоки (10^{-12} - 10^{-8} моль/л), то для их обнаружения обычно применяют легко детектируемую (определяемую) метку радиоактивным атомом, вводимым в один из компонентов (радиоактивный иод, тритий). Оказалось, что можно, без потери чувствительности метода, заменить радиоактивную метку на присоединение фермента, который можно обнаружить по его каталитической активности. Таким образом, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) могут быть определены любые вещества, обладающие свойствами антигенов и, конечно, многочисленные возбудители заболеваний человека, животных, растений.

Теперь, переходим к проблеме некоторых промышленных процессов с использованием иммобилизованных ферментов и клеток. Прежде всего, нас

интересует получение L-аминокислот. Как известно, аминокислоты - главный строительный материал организма, который формирует пептиды и белки. В отличие от растений и микроорганизмов, которые способны синтезировать все нужные им аминокислоты из более простых химических соединений, человек способен синтезировать лишь 12 из 20 аминокислот, необходимых для его жизнедеятельности. Остальные 8 аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан) получили название незаменимых и должны поступать в организм с пищей. При нехватке хотя бы одной из незаменимых аминокислот замедляется рост организма, проявляется патология. В этой ситуации важно уметь синтезировать эти аминокислоты в промышленных масштабах для корректировки питания в лечебных и профилактических целях. Здесь важно отметить, что производство многих аминокислот, в том числе и незаменимых, составляет большую отрасль химической промышленности. Но с помощью химических методов получается смесь оптических изомеров аминокислот (это смесь L- и D-аминокислот). В химических реакциях эти изомеры почти не различимы, но человеческий организм усваивает только L-аминокислоты (за исключением метионина). Для большинства биотехнологических процессов D-аминокислоты также не представляют ценности. Разделение смеси L- и D-аминокислот на составляющие их изомеры стало первым процессом в мире, осуществленным с помощью иммобилизованных ферментов на промышленном уровне.

Механизм разделения заключается в том, что используя в качестве исходного вещества ацилированные L- и D-аминокислоты, полученные органическим синтезом, прибегают к помощи фермента аминоксилазы, которая гидролизует один ацил – L-изомер, отщепляя от него ацильную группу и резко увеличивая растворимость образующейся L-аминокислоты в отличие от ацил - D-изомера. После этого вещества легко отделяются друг от друга и получается чистая L-аминокислота. Остающаяся ацил- D-аминокислота переходит в исходную смесь ацилированных L- и D-аминокислот, и процесс повторяют снова. Оказалось, что для аминоксилазы не имеет значения, какую аминокислоту ей гидролизовать, важно только строение ацильной части, к которой фермент имеет строгую специфичность. Поэтому одна и та же реакционная колонна с иммобилизованной аминоксилазой может быть применена в производстве самых различных аминокислот.

В промышленном процессе производства аминокислот очень важно, что иммобилизованный фермент легко готовить, так как он легко адсорбируется на специальной смоле, которую затем помещают в реакционную колонну. Когда активность катализатора падает ниже нормы, в колонну добавляют раствор свежего фермента (раз в несколько месяцев). Полимерный носитель отличается устойчивостью и может быть использован в течение нескольких лет.

Одним из интересных примеров применения биокатализа является его использование в тонком органическом синтезе. Уникальная специфичность действия ферментов, возможность проведения процессов в «мягких» условиях, протекание реакций с высокой скоростью при использовании малых количеств катализатора, практическое отсутствие побочных реакций - все это делает биокаталитические процессы перспективными с технологической точки зрения. Эти преимущества широко используются при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и так далее).

Для осуществления биокаталитического процесса необходимо:

1. провести поиск фермента необходимой специфичности или стереоспецифичности
2. изучить основные свойства исходных веществ и продуктов реакций
3. выявить факторы, определяющие эффективность биокаталитического превращения
4. создать на основе фермента подходящий катализатор для технологического процесса
5. провести аппаратное оформление биотехнологического процесса

Наибольшее применение в практике пока нашли именно гидролитические ферменты по следующим причинам:

1. гидролитические реакции термодинамически полностью сдвинуты в сторону образования продуктов
2. кинетика реакций ферментативного гидролиза легко описывается в количественном выражении
3. гидролазы наиболее изучены и легко управляемы
4. проведение оптимизации гидролитических ферментативных реакций в водном растворе проходит по двум параметрам - концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента.

Особенно эффектно возможности и достоинства гидролаз были продемонстрированы при модификации самых эффективных и широко применяемых антибиотиков - пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллина связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности остальной части, «ядра» антибиотика - 6-АПК.

Поскольку масштабный химический синтез таких соединений невозможен, самым простым путем проведения необходимого превращения является отщепление боковой цепи биосинтетического пенициллина, выделение 6-АПК и последующее ацилирование ее аминогруппы с получением «полусинтетического» аналога. Такая модификация представляет сложную задачу, так как при удалении боковой цепи необходимо расщепить весьма устойчивую амидную связь и сохранить значительно более лабильную связь в беталактамном кольце пенициллина; ее разрушение ведет к необратимой инактивации антибиотика.

Провести такую химическую реакцию в обычных условиях не удастся, так как при щелочном гидролизе пенициллинов выход 6-АПК не превышает 1%. Поэтому для удаления бокового радикала в молекуле антибиотика химическим путем необходим специальный подход, например, получение его иминоэфира и последующий гидролиз иминоэфира при низкой температуре. Это процесс многостадийный, энергоемкий, требует использование больших объемов органических растворителей. С другой стороны, подобное избирательное превращение может быть проведено в одну стадию в самых обычных условиях в водной среде с использованием фермента пенициллинамидазы.

Бензилпенициллин является исходным сырьем для получения (6-АПК), но в его молекуле присутствует чрезвычайно лабильное беталактамное кольцо и как уже говорилось выше, проведение химического деацилирования бензилпенициллина представляет трудную задачу. Поэтому в промышленности использовали для обработки бензилпенициллина бактериальную массу *E. coli*,

которая содержит фермент пенициллинамидазу. Этот фермент расщепляет именно ту амидную связь, которая необходима для образования б-АПК. В результате применения иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу, а затем и самой иммобилизованной пенициллинамидазы, удалось значительно повысить продуктивность и экономичность промышленного получения б-АПК.

В заключение этого раздела рассмотрим схему получения иммобилизованной аминоксилы (пенициллинамидазы). Продуцент фермента - бактерии *E.coli*. Эту микробную культуру выращивают и получают культуральную жидкость, которая в дальнейшем является источником фермента.

Сейчас в процессе производства полусинтетических бета-лактамов широко применяются коммерческие препараты иммобилизованной пенициллинамидазы. Вот некоторые примеры: пенициллинамидаза включенная в ПААГ - Россия; внеклеточная очищенная пенициллинамидаза сорбируемая на бентоните - США; пенициллинамидаза ковалентно связанная с полисахаридами - Швеция, фирма Astra.

Таким образом, переход к биокаталитической технологии значительно упрощает процесс, позволяет поднять выход целевого продукта, увеличить объем производства. Наконец, внедрение масштабного производства б-АПК привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

Аналогичным образом, иммобилизованная пенициллинамидаза используется при получении 7-аминодезацефалоспориновой кислоты, которая является ключевым соединением для синтеза новых цефалоспоринов со значительно расширенным спектром действия.

Основные направления использования ферментов как терапевтических средств:

- заместительная терапия при недостаточной функции пищеварительных желез и ряде наследственных заболеваний
- местная (локальная, литическая) для расщепления и удаления из организма некротических масс и экссудатов
- парентеральное применение свободных и связанных форм ферментов для лизиса тромбов в кровеносных сосудах и в качестве противовоспалительных средств

Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают следующие ферментные препараты:

- солизим (липолитический фермент, гидролизующий жиры, применяется при желудочно-кишечных заболеваниях)
- α -амилаза (сахаролитический фермент), гидролизующий крахмал, который входит в состав лечебного препарата «Фестал», используется при недостаточной функции поджелудочной железы.
- террилитин (протеолитический фермент), рекомендуется при лечении гнойных ран, ожогов, трофических язв.
- стрептокиназа (фибринолитический фермент), используется при тромбозах

- β -галактозидаза (сахаролитический фермент) используется при лактазной недостаточности.

Традиционные биотехнологии, основанные на переработке тканей животных представлены:

1. трипсином, химотрипсином (протеолитические ферменты) и используются для рассасывания рубцов и спаек.
2. урокиназой (протеолитический фермент), которая используется при лечении тромбозов
3. пепсином (протеолитический фермент), который используется при расстройствах пищеварения.

Дополнительный материал (в кратком изложении) по технологии производства ферментных препаратов

Основные позиции биотехнологии производства ферментов

1. Общие понятия и определение свойств ферментов, влияющих на специфику их производства.
2. Определение качественных критериев в оценке получаемых ферментных препаратов - нормируемый показатель качества.
3. Определение факторов, влияющих на биосинтез ферментов. Примеры.
4. Технологический процесс производства ферментов.
 - 4.1. Глубинный метод.
 - 4.2. Поверхностное культивирование продуцентов.
5. Определение возможности иммобилизации ферментов в развитии инженерной энзимологии.
 - 5.1. Сущность иммобилизации ферментов.
 - 5.2. Совершенствование технологии получения ферментов.
 - 5.3. Выбор (анализ) носителя для иммобилизации ферментов на производстве в зависимости от конечного продукта.
 - 5.4. Анализ методов иммобилизации ферментов.
 - 5.5. Сферы применения иммобилизованных ферментов (препаратов ферментов)
 - 5.6. Анализ возможностей иммобилизации клеток

Свойства ферментов, влияющие на специфику их производства

- Высокая каталитическая активность
- Избирательность действия (абсолютная специфичность)
- Оптимальные значения pH
- Оптимальные значения температуры

Количественная оценка содержания фермента

- по количеству образовавшихся продуктов реакции
- по количеству израсходовавшегося субстрата

За единицу активности фермента принимают то его количество, которое катализирует превращение 1 микромоля субстрата в 1 минуту при определенных стандартных условиях и это есть стандартная единица активности.

Решением Международного биохимического Союза решено определять активность фермента при температуре 30°C по начальной скорости реакции,

когда концентрация насыщенного фермента и временная зависимость близка к кинетике реакции нулевого порядка.

Определение активности фермента зависит также от наличия в нем балласта, т.е.,

- ✓ при отсутствии балласта расчет идет на 1 мг фермента
- ✓ при наличии балласта расчет идет на 1 мг белка в ферментном препарате.

Итак, активность ферментного препарата выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего под действием 1 мл ферментного раствора или 1 грамма препарата за 1 минуту в стандартных условиях.

Факторы, влияющие на биосинтез ферментов:

- ❖ Генетические (мутагенез)
- ❖ Условия культивирования (температура, рН, время)
- ❖ Питательная среда (основные компоненты, индукторы, репрессоры, факторы роста, микроэлементы)

Глубинный метод производства ферментов

Получение ферментов методом глубинного культивирования.

Приготовление питательной среды → выращивание посевного материала → ферментация (производственное культивирование) → выделение → очистка → концентрирование → получение субстанции (товарная форма).

Метод поверхностного культивирования продуцентов

Получение ферментов методом поверхностного культивирования

Приготовление питательной среды (состав, структура, стерилизация) → выращивание посевного материала (культуры)* → ферментация → выделение** → очистка*** → концентрирование → получение субстанции.

*культура, выросшая на твердой питательной среде (получение посевной культуры реализуется последовательно в пробирке, в колбах на качалке и в инокуляторе)

*споровый материал

*мицелиальная культура, выращенная глубинным способом

** выделение - это экстракция (экстрагент - вода)

***очистка предусматривает:

- ✓ освобождение от нерастворимых веществ
- ✓ освобождение от сопутствующих растворимых веществ
- ✓ фракционирование (хроматография)

Иммобилизация клеток

Используют химический метод иммобилизации с образованием ковалентных связей с активированным носителем, на поперечной сшивке клеток за счет активных групп в клеточной оболочке с бифункциональными реагентами (например, глутаровым альдегидом).

К физическим методам относятся в данном случае адсорбция и агрегация. Наибольшее распространение получило включение клеток в состав гелей, мембран, волокон, что позволяет сохранить жизнеспособность клеток.

Преимущества иммобилизованных клеток перед иммобилизованными ферментами

- отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов
- снижение затрат на выделение и очистку продуктов реакции
- более высокая активность и стабильность

- возможность автоматизации процессов
- длительность использования и функционирования полиферментных систем без экзогенных кофакторов

2.5. Терминологическая идентификация ключевых понятий по биотехнологии ферментов.

Для повышения качества получаемых знаний и умений также можно использовать тренинг по свободному владению терминами, определяющими специфику данной темы.

Расшифруйте ниже представленные термины:

1. биообъект
2. продуцент
3. биокатализатор
4. биосинтез
5. биотрансформация (биоконверсия)
6. репарация
7. мутагенез
8. мутация
9. пассаж
10. скрининг
11. штамм
12. прокариот
13. эукариот
14. селекция биообъектов
15. ферменты
16. ферменты простые
17. ферменты сложные
18. холофермент
19. апофермент
20. коферменты
21. кофакторы
22. конститутивные ферменты микробной клетки
23. индуцибельные (адаптивные) ферменты
24. индукция фермента
25. оксиредуктазы
26. трансферазы
27. гидролазы
28. лиазы
29. изомеразы
30. лигазы
31. инженерная энзимология используется в производстве
32. промышленный биокатализатор
33. интактная клетка
34. пермеабелизованная клетка
35. денатурация фермента
36. энзимопатология
37. энзимодиагностика
38. энзимотерапия

39. факторы роста
40. транзистентная репрессия
41. катаболитная репрессия (глюкозный эффект)
42. азоткатаболитная репрессия
43. фосфаткатаболитная репрессия
44. глубинный метод ферментации
45. поверхностный метод ферментации
46. нормируемый показатель качества (степень чистоты)
47. подготовительные стадии биосинтеза
48. основная стадия биосинтеза
49. оценка гомогенности ферментного препарата
50. активность ферментного препарата
51. свойства ферментов, определяющих специфику их производства
52. внутренние факторы, влияющие на биосинтез ферментов
53. внешние факторы, влияющие на биосинтез ферментов
54. ферментер
55. массообмен в ферментере
56. продуктивность биосинтеза зависит
57. ферментация периодическая
58. ферментация полупериодическая
59. ферментация многоциклическая
60. ферментация непрерывная
61. пассивная диффузия
62. активный транспорт
63. облегченная диффузия
64. «симпорт»
65. «унипорт»
66. «антипорт»
67. ПААГ
68. 6-АПК

3. Стероиды как лекарственные средства биотехнологического производства

3.1. Введение

Материалы практикума необходимы студентам для правильного выбора тех звеньев биотехнологического процесса получения стероидных гормонов, которые определяют его максимальную эффективность. Тема «Стероиды как лекарственные средства биотехнологического производства» посвящена биотехнологическим методам получения этих препаратов. Представленный материал включает характеристики промышленных штаммов-биотрансформаторов, а также технологические особенности биоконверсии исходного сырья. Представлены основные типы химических модификаций, осуществляемые промышленными штаммами-биотрансформаторами, приведена классификация микробиологических трансформаций. На конкретных примерах показаны методы выделения, очистки и определения количественного содержания целевых продуктов. Показано преимущество использования биотехнологических методов в промышленном производстве стероидных лекарственных препаратов.

Цель изучения темы: ознакомление студентов с биотехнологическими методами, используемыми в фармацевтической промышленности для получения стероидных препаратов. Понятие мутантные штаммы-биотрансформаторы. Порядок осуществления индуцибельными ферментами большинства реакций биотрансформации.

3.2. Проведение практических занятий

Изучение темы распределено на 2 занятия. Первое занятие включает общий объем времени 2 часа 35 мин. с перерывом 15 мин. (2 часа 20 мин. рабочего времени).

NB! Студенты должны иметь предварительную информацию по подготовке к данной теме (обучающий диск, учебник и руководство к практическим занятиям, а также лекции).

Первое занятие строится следующим образом (хронокарта 1).

1. Введение (название темы, актуальность, проблемы качества и рентабельности производства)
.....30 мин.
2. Входной контроль по блиц-тестам (5 вопросов) 10 мин.
3. Раздача ситуационных задач (по выбору преподавателя) и дополнительных учебных материалов (пособие № 6) 5 мин.
4. Рекомендации преподавателя по работе с информационным материалом 25 мин.
5. Перерыв15 мин.
6. Самостоятельная работа студента (это часть аудиторной работы проводится под консультативным руководством преподавателя, а её завершение - остается в качестве самостоятельной работы вне аудитории для каждого студента в группе) 60 мин.
7. Подведение итогов занятия с отметкой в журнале, сбор методических материалов10 мин.

Пояснения к занятию.

- а). В случае отсутствия студента на занятии, входной тест заменяется в дальнейшем на вопросы входного контроля на отработках.
- б). В случае отрицательного результата по тесту при подписании успешно выполненной работы студенту предлагаются 2-3 дополнительных вопроса по теме (могут быть вопросы из входного контроля).
- в). Задачи раздаются по выбору преподавателя.
- г). Ответственность за выданные пособия несет каждый студент персонально.
- д). Обратить внимание студентов на работу с выданными пособиями в интервале ограниченного времени в аудитории (это связано как с аудиторной работой, так и с итоговыми зачетными тестами).

Рекомендации по работе с пособиями.

Всем студентам независимо от предложенной задачи обратить внимание на:

- актуальность применения стероидных лекарственных препаратов в современной фармакотерапии, улучшение качества целевого продукта (степени чистоты) и возможных экологических проблем утилизации отходов производства
- ресурсы для получения стероидных лекарственных препаратов
- классификацию микробиологических трансформаций
- основные микробиологические превращения стероидов
- проблемы появления примесей (эпимеров) и их решение
- контроль качества на производстве (аналитический и микробиологический)
- методы получения и организация процессов получения гидрокортизона и преднизолона
- использование чистых культур микроорганизмов для биотрансформации.

При подготовке ответа на задачу можно также использовать лекционный материал (более подробно - см. ниже).

Второе занятие включает общий объем времени 2 часа 35 мин. с перерывом 15 мин. (2 часа 20 мин. рабочего времени). Студент приходит на занятие с подробным протоколом решения поставленных задач и технологическим обоснованием (все записи должны быть представлены в тетради с обозначением ФИО и № группы на обложке для регистрации выполнения задания и подписи преподавателя в случае положительной оценки работы).

Занятие строится следующим образом (хронокарта - 2).

- 11. Проверка готовности к защите представленной работы (наличие подробного конспекта, графики, рисунки, комментариев в аспекте поставленных задач и решений) 15 мин.
- 12. Защита работы: каждому студенту дается около 8 мин. на устное выступление с планом защиты (по выбору преподавателя - 5 студентов из группы) 50 мин.
- 13. Перерыв 15 мин.
- 14. Продолжение защиты работ (5 студентов из группы по выбору преподавателя) 50 мин.

15. Подписание работ с отметкой в журнале* (для студентов, которые не выступали с устным докладом). Объявление новой темы следующего занятия для домашней подготовки (диск, учебник, руководство к практическим занятиям по фармацевтической биотехнологии, лекции)25 мин.

**Для подписания работы студенту необходимо предоставить оформленную рабочую тетрадь (более подробно - см. ниже) и расширенный протокол ответа по выданной преподавателем задаче. При этом студент должен быть готовым ответить на любой вопрос по теме занятия, включая контрольные вопросы и рабочую тетрадь.*

3.3. Оценочные средства

3.3.1. Входной контроль по теме «Стероиды как лекарственные средства биотехнологического производства» (допускается только один правильный ответ)

Вариант 1

1. В медицинской практике стероидные гормоны биотехнологического производства применяются как лекарственные средства:
 - а. противовоспалительные
 - б. диуретические
 - в. анаболические
 - г. противораковые
 - д. верно все
2. Укажите модифицированные источники природных соединений, используемые для получения стероидных ЛС:
 - а. холестерин
 - б. эргостерин
 - в. андростендион
 - г. диосгенин
 - д. ситостерин
3. Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является β - ситостерин, а продуктом андростендион или андростадиендион:
 - а. *Rhizopus nigricans* - 11 α гидроксирование
 - б. *Culvalaria lunata* - 11 β гидроксирование
 - в. *Streptomyces roseochromogenus* - 16 α гидроксирование
 - г. *Arthrobacter simplex* - 1,2 дегидрирование
 - д. *Mycobacterium vacca* - окисление боковой цепи стерина
4. Биотрансформация стероидов - это процесс, осуществляемый наиболее рентабельно и качественно с помощью:
 - а. индивидуальных ферментов в процессе глубинной ферментации
 - б. индивидуальных ферментов в процессе поверхностной ферментации

- в. растущей на среде культурой в процессе поверхностной ферментации
 - г. растущей на среде культурой в процессе глубинной ферментации
 - д. верно все
5. Проблема эффективности биотрансформации стероидов при получении ЛС в промышленном масштабе состоит в их малой растворимости, на что может повлиять использование:
- а. высоких температур
 - б. двухфазных систем
 - в. органических растворителей
 - г. буферных растворов
 - д. растворимых комплексов

Вариант 2

1. Структурные отличия кортизола (гидрокортизона) от холестерина в том, что при:
- а. углеродном атоме в 3-ем положении имеется =O группа и C-4-C-5 – двойная связь
 - б. углеродном атоме в 3-ем положении имеется –ОН группа и C-4-C-5 – двойная связь
 - в. при C-4- C-5 – двойная связь и при C-17– алифатическая боковая цепь
 - г. при C-5 - C-6 – двойная связь и при C-17 – алифатическая боковая цепь
 - д. при C-17 – алифатическая боковая цепь
2. Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является прогестерон, а продуктом 11 α гидроксопрогестерон:
- а. *Rhizopus nigricans* – 11 α гидроксирование
 - б. *Culvalaria lunata* – 11 β гидроксирование
 - в. *Streptomyces roseochromogenus* – 16 α гидроксирование
 - г. *Arthrobacter simplex* – 1,2 дегидрирование
 - д. *Mycobacterium vacca* – окисление боковой цепи стерина
3. Выберите наиболее дешевый и доступный источник для производства стероидных гормонов из класса фитостероинов:
- а. диосгенин
 - б. соласодин
 - в. стигмастерин
 - г. ситостерин
 - д. эргостерин
4. Эффективная биотрансформация происходит только в случае использования:
- а. стадии активного роста культуры

- б. стадии стабильного роста культуры
 - в. стадии насыщения питательной средой составляющими ее компонентами
 - г. повышения растворимости субстрата
 - д. модификаций субстрата и повышения селективности микроорганизма-трансформатора
5. Выделение продукта трансформации гидрокортизона состоит из последовательных стадий:
- а. очистка, фильтрование, экстракция, сепарация.
 - б. сепарация, экстракция, фильтрование, очистка
 - в. экстракция, сепарация, фильтрование, очистка
 - г. фильтрование, сепарация, экстракция, очистка
 - д. сепарация, экстракция, очистка, фильтрование

Вариант 3

1. Отличительной особенностью строения кортикостероидов является:
 - а. наличие кислородной группы у 3-его углеродного атома
 - б. наличие кислородной группы у 11-ого углеродного атома
 - в. наличие двойной связи в положении C-4 -- C-5
 - г. наличие двойной связи в положении C-5 -- C-6
 - д. наличие гидроксизамещенной ацетильной группы при C-17.
2. Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является вещество S. Рейхштейна, а продуктом – гидрокортизон:
 - а. *Rhizopus nigricans* - 11 α гидроксирование
 - б. *Mycobacterium vacca* - окисление боковой цепи стерина
 - в. *Streptomyces roseochromogenus* - 16 α гидроксирование
 - г. *Culvalaria lunata* - 11 β гидроксирование
 - д. *Arthrobacter simplex* - 1,2 дегидрирование
3. Процесс ферментативного превращения вещества S. Рейхштейна в гидрокортизон можно сделать более рентабельным в производстве, если:
 - а. стабилизировать пространственную конфигурацию субстрата
 - б. использовать культуры микроорганизмов в активной фазе роста
 - в. использовать микроорганизмы в стабильной фазе роста
 - г. использовать широкую субстратную специфичность микроорганизмов-трансформаторов
 - д. использовать узкую субстратную специфичность микроорганизмов-трансформаторов
4. Наличие гидроксильных групп обуславливает физиологическую активность большинства гормональных стероидных препаратов, если это соответствует определенному положению в структуре стероида:

- а. С-5
 - б. С-6
 - в. С-11
 - г. С-14
 - д. С-21
5. Наиболее перспективным направлением для снижения себестоимости и повышения качества целевого продукта в биокатализе является:
- а. химическая модификация субстрата
 - б. повышение селективности микроорганизма-трансформатора
 - в. повышение растворимости стероидов
 - г. индуцирование растущей культуры
 - д. иммобилизация живых клеток микроорганизма-трансформатора

Вариант 4

1. В результате микробиологической трансформации происходит:
- а. изменение молекулярной массы трансформируемого вещества
 - б. изменение активности ферментов
 - в. изменение молекулярной структуры
 - г. синтез молекул «de novo»
 - д. реакция комплексообразования
2. Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является гидрокортизон, а продуктом – преднизолон:
- а. *Rhizopus nigricans* - 11 α гидроксирование
 - б. *Culvalaria lunata* - 11 β гидроксирование
 - в. *Streptomyces roseochromogenus* - 16 α гидроксирование
 - г. *Arthrobacter simplex* - 1,2 дегидрирование
 - д. *Mycobacterium vacca* - окисление боковой цепи стерина
3. При получении гидрокортизона из вещества S. Рейхштейна гидроксирование в 11- β положении не сопровождается образованием побочных минорных продуктов (гидроксипроизводных эпимеров) за счет гидроксирования в положении:
- а. 11 α
 - б. 14 α
 - в. 3 β
 - г. 6 β
 - д. 17 α
4. Преимущества иммобилизации клеток микроорганизма-трансформатора - это:
- а. более высокая активность ферментов
 - б. стабильность процесса, автоматизация

- в. уменьшение затрат на очистку целевого продукта
 - г. длительное функционирование полиферментных систем и регенерация кофакторов
 - д. верно все
5. Укажите, какие ЛС можно получить из андростендиона (АД) с помощью химических модификаций:
- а. тестостерон
 - б. метилтестостерон
 - в. оксипрогестерон
 - г. спиронолактон
 - д. верно все

Примечание: если студент пропускает 1-ое занятие - входной контроль заменяется на многотестовый контроль с последующей выдачей ситуационной задачи (при положительной оценке этих вопросов преподавателем).

3.3.2. Интерактивный формат контакта преподавателя и студентов с предложением списка вопросов и коротких ответов по изучаемой теме (1-2 мин).

Списки вопросов находятся на руках студентов. Каждый студент задает вопрос другому студенту. В случае затруднений с ответом, на данный вопрос может отвечать любой другой студент. Ответ оценивается преподавателем и вносится в сумму общей оценки по предложенной теме.

1. Понятие микробиологических трансформаций.
 2. Принцип классификации микробиологических трансформаций.
 3. Основные реакции микробиологических трансформаций.
 4. Основание (скелет) большого класса стероидов.
 5. Ресурсы стероидов (2 класса).
 6. Зоостерины.
- Ответ. Стероиды животных клеток.
7. Самый известный зоостерин.
 8. Фитостерины.
 9. Фитостерины в биотехнологии ЛС. Примеры.
 10. Проблема использования холестерина как ресурса в биотехнологии ЛС.
 11. Проблема использования фитостероидов как ресурса в биотехнологии ЛС.
 12. Синоним кортизола.
 13. Синтетические аналоги кортизола.
 14. Уникальность терапевтических свойств кортизола и его аналогов.
 15. Специфика химического строения кортизола.
 16. Специфика химического строения гидрокортизона.
 17. Продукт биотрансформации при 11 β -гидроксилировании вещества S микроорганизмом *Curvularia lanata*.
 18. Продукт биотрансформации при 1,2-дегидрировании гидрокортизона микроорганизмом *Arthrobacter simplex*.

19. Продукт биотрансформации β -ситостерина с отщеплением боковой цепи микроорганизмом *Mycobacterium vacca*.
20. ЛС - продукты биотрансформации андростендиона (АД).
21. Ключевое вещество в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона
22. Продукт биотрансформации вещества S. Рейхштейна.
23. Биотрансформация гидрокортизона в преднизолон осуществляется культурами:
24. При биотрансформации стероидов штаммом *Corynebacterium mediolanum* сохраняется целостность:
25. Побочные продукты гидроксилирования в положении 14 α , 6 β в смеси с 11 β называются:
26. Снижение качества гидрокортизона обуславливает наличие:
27. Физиологическую активность гидрокортизона обуславливает наличие гидроксильной группы в:
28. Усиление активности и снижение побочных эффектов у преднизолона в отличие от гидрокортизона обусловлено появлением в его структуре:
29. Какие ферменты обладают самой широкой субстратной специфичностью?
30. Низкая производительность ферментаций стероидов является:
31. Реакции гидроксилирования чаще всего осуществляют:
32. Реакции дегидрогенизации стероидов с образованием двойной связи осуществляют:
33. Реакция, лежащая в основе получения преднизолона из гидрокортизона:
34. Окисление гидроксильной группы в кетогруппу осуществляют:
35. Микробиологический контроль осуществляется только на стадии:
36. Стадия аналитического контроля осуществляется:
37. Пути интенсификации микробиологических трансформаций.
38. Физические методы повышения растворимости стероидов.
39. Химические методы повышения растворимости стероидов.
40. Преимущества биотехнологии в получении стероидных препаратов.

3.3.3. Варианты ситуационных задач по биотехнологии стероидов как лекарственных средств биотехнологического производства в соответствии с требованиями фармацевтического рынка.

Студенты должны уметь актуализировать любую задачу из ниже представленных, определить проблемы и найти оптимальные и аргументированные решения. Все это записывается в протокол для защиты либо как выступление, либо как собеседование с преподавателем.

Задача 1.

Определите сущность микробиологической трансформации органических соединений и актуальность (потребности фармацевтического рынка) микробиологической трансформации стероидных соединений. Связь биологической активности стероидов с их строением.

Задача 2.

Охарактеризуйте природные стерины как сырье для получения ценных лекарственных средств.

Задача 3.

Технологические рекомендации по использованию модифицированных стероидов как субстратов для проведения соответствующих целенаправленных биотрансформаций.

Задача 4.

Технологические рекомендации относительно требований к микроорганизмам-трансформаторам в промышленном производстве стероидных гормонов.

Задача 5.

Опишите микробиологическое гидроксирование, как наиболее важный и часто применяемый метод в получении гормональных стероидных препаратов. Определите возможный тип ферментации.

Задача 6.

Опишите микробиологические трансформации при получении преднизолона. Определите специфику проведения биокатализа в подготовительных и основных стадиях.

Задача 7.

Как решается проблема низкой производительности ферментаций, несмотря на высокий процентный выход по субстрату?

Задача 8.

Сравнительная характеристика холестерина, эргостерина, стигмастерина и β -ситостерина, как природных стеринов для получения ЛС.

Задача 9.

Основные пути биосинтеза стероидных гормонов из холестерина через основной промежуточный продукт – прегненолон.

Задача 10.

Дегидрогенизация стероидов и микроорганизмы-трансформаторы.

Задача 11.

Получение преднизолона из кортизона.

Задача 12.

Гидролиз эфиров стероидов. Отщепление боковых цепей стероидов с сохранением стероидного скелета.

Задача 13.

Конструкция аппаратов для проведения ферментационных процессов при получении стероидов.

Задача 14.

Проблемы стерилизации в организации процесса биотрансформаций.

Задача 15.

Технологические условия проведения биотрансформации стероидов.

Задача 16.

Проблемы микробиологического контроля при трансформации стероидов.

Задача 17.

Стадии выделения и очистки стероидных препаратов после завершения трансформации.

Задача 18.

Специфика выращивания трансформирующих культур и специфика процесса трансформации с минимизацией возможности загрязнения посторонней микрофлорой.

Задача 19.

Пример промышленного использования микробиологических трансформаций при получении гидрокортизона из вещества S.

Задача 20.

Пример промышленного использования микробиологических трансформаций при получении преднизолона из гидрокортизона. Схема дегидрирования микрокристаллического гидрокортизона.

Задача 21.

Пути интенсификации микробиологических трансформаций с целью повышения качества и рентабельности производства.

Задача 22.

Минорные компоненты (эпимеры), как примеси при биотрансформации вещества S с использованием различных биообъектов.

**Представленные задачи рассматриваются как проблематика биотехнологического процесса производства стероидных гормонов в соответствии с требованиями фармацевтического рынка и выдаются каждому студенту на внеаудиторную самостоятельную работу в конце первого лекционно-семинарского занятия для подготовки к защите полученного задания на втором занятии. Время защиты каждого студента 10-15 мин. в присутствии преподавателей перед группой в логической последовательности представленных задач при наличии расширенного конспекта по данной задаче в рабочей тетради для получения зачета в случае удовлетворительной оценки.*

3.3.4. Рекомендуемая форма протокола по решению практических задач

1. Название темы

2.5. Сущность вопроса.

2.6. Актуальность темы.

2.7. Анализ существующих проблем.

3. Целевые задачи по решению проблем в части:

3.1. Специфика ресурсов биотехнологического производства ЛС и БАВ.

3.1.1. поиск и отбор биообъектов (скрининг)

3.1.2. требования производства к промышленному штамму

3.1.3. возможности получения промышленного штамма в лаборатории

3.1.4. возможности идентификации продуцентов

3.1.5. проблемы хранения продуцентов

3.2. Особенности биотехнологического процесса (биосинтеза или биокатализа) в промышленном производстве ЛС.

3.2.1. подготовительные стадии биосинтеза или биокатализа

3.2.2. основные стадии биосинтеза или биокатализа

3.2.3. режимы ферментационных процессов в сравнительном анализе

3.2.4. управление ферментационными процессами

3.3. Оценка качества и количества конечного продукта (рентабельность)

3.4. Возможности повышения качества целевого продукта и рентабельности биотехнологического производства.

Заключение (выводы) в формате резюме.

3.3.5. Рекомендуемый формат рабочей тетради по написанию протокола студентами.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.
Сеченова (Сеченовский Университет)
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАРК БИОМЕДИЦИНЫ
ИНСТИТУТ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Кафедра биотехнологии

Рабочая тетрадь по теме: Стероиды как лекарственные средства биотехнологического производства

Выполнил -----

Преподаватель -----

3.3.6. Теоретическая часть (в рамках внеаудиторной работы)

1. Применение стероидных препаратов в медицине.
2. Сравнительный анализ наиболее ценных кортикостероидов, прогестогенов, эстрогенов и андрогенов по химической структуре и использованию.
3. Значение биотрансформации на примере получения кортизона.
4. Ресурсы, используемые в производстве гормональных препаратов стероидной структуры.
5. Схема получения андростендиона (АД) и андростадиендиона (АДД) из ситостерина. Методы выделения, аналитического контроля и примеры получаемых препаратов для терапии.
6. Приведите примеры трансформации стероидов разными группами микроорганизмов (грибы и фикомицеты, бактериальные культуры).
7. Повышение эффективности ферментационных процессов при получении стероидных препаратов.
7. Вещество S.Рейхштейна как источник получения гормональных препаратов стероидной структуры.
8. Иммобилизация, как источник повышения эффективности биотрансформации на примере стероидных соединений.

3.3.7. Практическая часть (в рамках аудиторной работы)

1. Приведите характеристику природных стероидов в сравнении их химических структур.
2. Приведите наиболее оптимальные микробиологические трансформации стероидов, имеющие промышленное значение.
3. Приведите пример использования модифицированного стероида как субстрата для получения гидрокортизона.
4. Приведите возможности стимуляции роста трансформирующих штаммов.
5. Определите возможности микробиологического контроля на стадии выращивания трансформирующей культуры.
6. Методы очистки стероидов как лекарственных препаратов.
7. Меры предохранения трансформационной среды от загрязнения посторонней микрофлорой.
8. Технологическая схема получения гидрокортизона (кортизола) по стадиям.
9. Технологическая схема получения преднизолона из гидрокортизона по стадиям.

10. Пути интенсификации микробиологических трансформаций.

3.3.8. Контрольные вопросы для защиты темы «Стероиды как лекарственные средства биотехнологического производства»

1. Сущность микробиологических трансформаций и основные представители стероидных препаратов на фармацевтическом рынке.
2. Связь биологической активности кортикостероидов и их структуры.
3. Ресурсы (природные и модифицированные).
4. Сравнение зоостероинов и фитостероинов в части их структуры и возможности использования в биотехнологии получения ЛС.
5. Использование ферментативных реакций с учетом получения целевого продукта.
6. Микроорганизмы – трансформаторы, требования к ним и примеры использования.
7. Специфика производства кортикостероидов в организации технологического процесса.
8. Специфика производства в контроле качества целевого продукта.
9. Предварительные и основные стадии биотехнологического производства стероидных препаратов.
10. Пути повышения качества и рентабельности производства стероидных препаратов.

3.4. Рекомендуемые информационные материалы

Лекция «Получение лекарственных средств на основе биотрансформации стероидных соединений»

План.

1. Возможности использования микроорганизмов в создании лекарственных средств стероидной структуры.
2. Краткая историческая справка по развитию трансформации стероидов.
3. Основные стероидные препараты.
 - 3.1. Структура стероидных препаратов.
 - 3.2. Сырье для получения стероидных гормонов.
 - 3.3. Пути биосинтеза стероидных гормонов в организме (холестерин).
 - 3.4. Основные микробиологические трансформации стероидов в промышленности.
4. Пути дальнейшего развития микробиологической трансформации стероидов.

Применение микроорганизмов в области синтеза лекарственных средств можно разделить на два направления:

1. Полный биосинтез микроорганизмами биологически активных веществ (антибиотиков, витаминов, ферментов, стероидов, аминокислот и других веществ).

2. Микробиологические трансформации, состоящие из перемежающихся между собой отдельных химических и микробиологических стадий в общем синтезе лекарственных средств.

Преимущества использования микроорганизмов в биосинтезе перед тонким органическим синтезом в создании лекарственных:

- значительно упрощается синтез лекарственных средств за счет уменьшения количества стадий
- появляется возможность осуществления тех реакций, которые достаточно трудны или вообще не осуществимы химическим синтезом
- продукты биосинтеза получаются более чистые, без побочных примесей
- осуществление рентабельного промышленного синтеза лекарственных средств в целом и, в частности, стероидных гормонов (пример промышленного синтеза гидрокортизона, преднизолона, дексаметазона, кстати, осуществленного только после разработки микробиологических способов их получения).

Сегодня потребность в стероидных препаратах продолжает расти. Как известно, вышеперечисленные препараты широко применяются при лечении тяжелых ревматических заболеваний, бронхиальной астмы, различных воспалительных процессов и хронических кожных заболеваний.

Нужно отметить, что большинство процессов микробиологической трансформации приводит к незначительной перестройке молекулы субстрата. Эта трансформация может осуществляться одним или несколькими ферментами. В настоящее время принята классификация микробиологических трансформаций по типу возникновения или отщепления функциональных групп.

К основным процессам микробиологической трансформации относятся: окисление, восстановление, гидролиз, дегидрирование, декарбоксилирование, дезаминирование, образование гликозидов, метилирование, ацетилирование и другие реакции.

Что касается истории развития микробиологической трансформации стероидов, то первые сообщения на эту тему появились раньше, чем было установлено строение основных представителей стероидов. Еще в конце девятнадцатого века стало известно, что бактериальная флора кишечника млекопитающих превращает холестерин в капростерин, а холевую кислоту в дезоксихолевую.

В 1908 году была открыта способность кишечной палочки (*E.coli*) окислять гидроксильные группы стероидных соединений.

В 1948 году впервые осуществили введение гидроксильной группы в молекулу стероида микробиологическим путем.

В 1949 году было выявлено эффективное антиревматическое действие кортизона и произведен синтез ацетата кортизона из дезоксихолевой кислоты, но с низким выходом продукта всего 15%. Только через 3 года, появилась возможность промышленного использования микроорганизмов в синтезе лекарственных средств стероидной структуры, после получения 11 α -гидроксипрогестерона из прогестерона культурой *Rhizopus nigricans*, но уже с высоким выходом продукта. А ещё через 2 года, используя микробиологическое 1,2-дегидрирование кортизона бактериями *Corynebacterium simplex* был получен широко применяемый в медицинской практике более активный и менее токсичный преднизолон.

Теперь, о структуре основных стероидных препаратов. Все они характеризуются наличием в молекуле специфического циклического скелета (ядра) - циклопентанпергидрофенантрена, состоящего из четырех сконденсированных колец, три из которых шестичленные (А, В и С) и одно пятичленное (D). Для обозначения различных положений этого кольца принята следующая нумерация (рис.1).

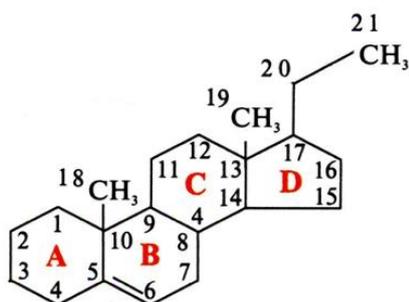


Рисунок 1. Ядро циклопентанпергидрофенантрена.

Производные этого циклического ядра называются стеринами или стеролами. К стеринам (стеролам) относятся стероиды, у которых в положении С-3 углеродного скелета имеется гидроксильная группа (рис.2).

Основные представители стероидных препаратов:

- *кортикостероиды (гидрокортизон, преднизолон)*
- *прогестогены (прогестерон, оксипрогестерон)*
- *андрогены (тестостерон, метилтестостерон)*
- *эстрогены (эстрон)*

Все они содержат при С-3 кетогруппу, кроме эстрогенов. Андрогены и эстрогены содержат при С-17 карбонильную или гидроксильную группу. Их аналоги при С-17 имеют алкильную или этинильную группы. Прогестогены и кортикостероиды принадлежат к замещенным прегнанам, то есть при С-17 содержат гидроксизамещенную ацетильную группу. Отличие кортикостероидов в том, что они имеют кислородную группу при С-11.

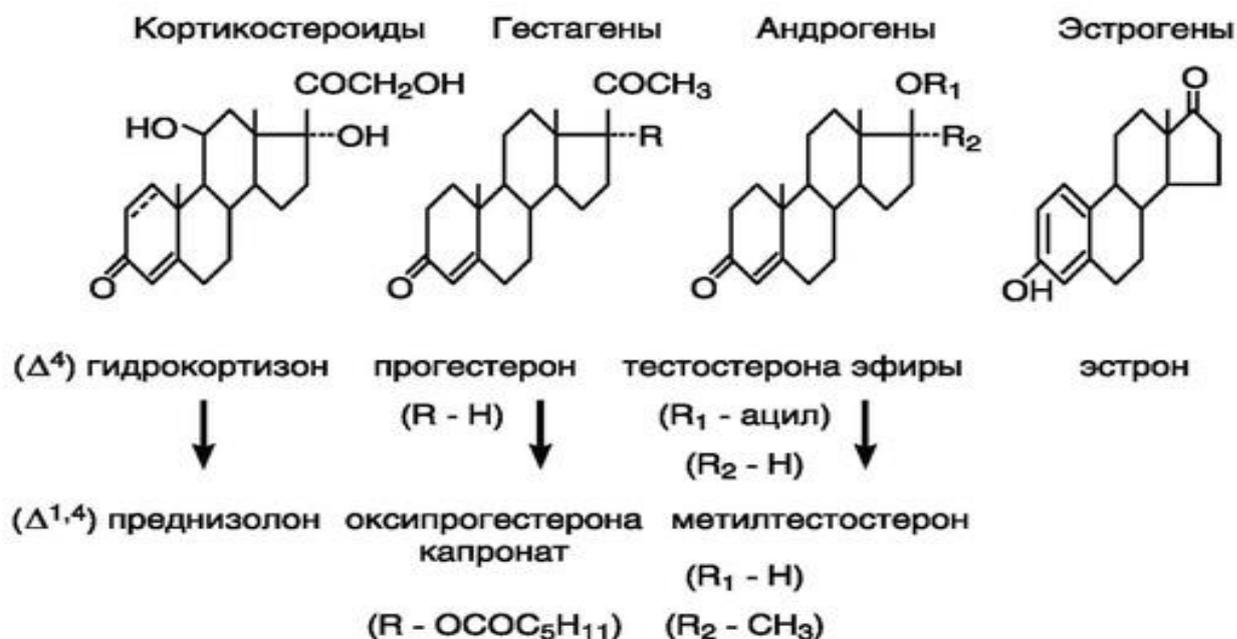


Рисунок 2. Структура важнейших стероидных гормонов

Проблема сырья для получения стероидных препаратов (стероидных гормонов).

Одним из наиболее важных и изученных стероидов является *холестерин* (класс *зоостеринов*), химическая формула которого была установлена в 1932 году (рис.3). Он обнаруживается почти во всех органах и тканях животных и человека, принимает участие в развитии растущего организма. Спинной мозг и мозг рогатого скота является наилучшим материалом для промышленного получения холестерина.

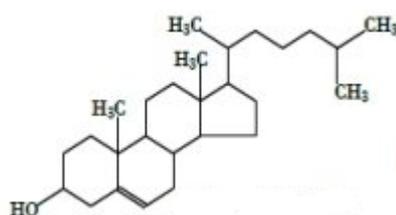


Рисунок 3. Холестерин

Класс фитостеринов (стерины растений).

Эргостерин в отличие от холестерина имеет дополнительную метильную группу при C-24 и двойные связи при C-7 и C-22,23 (рис.4). Эргостерин является провитамином витамина D (строение его установлено в 1934г.). Особенно много эргостерина у дрожжевых микроорганизмов, в пекарских дрожжах.

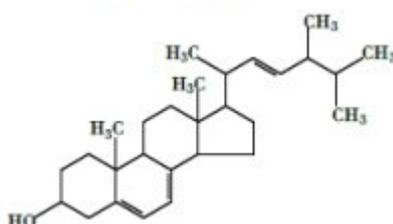


Рисунок 4. Эргостерин

Стигмастерин содержится в соевом масле, в сахарном тростнике и отличается от холестерина наличием этильной группы при С-24 (рис.5).

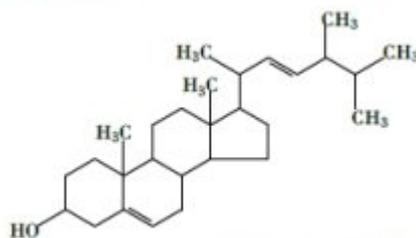


Рисунок 5. Стигмастерин

β-ситостерин. Это наиболее экономичный вид стероидного сырья. Содержится во всех растениях и в отходах древесины. Коммерческий источник его – это тростник и хлопковое масло. β-ситостерин является аналогом стигмастерина, но в отличие от него не имеет двойной связи в боковой цепи (рис.6).

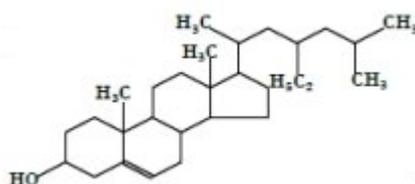


Рисунок 6. β-ситостерин

Диосгенин содержится в растении диоскорея - это дорогое, импортное сырье. *Соласодин* содержится в паслене дольчатом, который растет в Казахстане. Это сырье дорогое и также как и диосгенин - не рентабельно для биотехнологического производства.

Для практического решения вопроса об использовании β-ситостерина в производстве стероидных гормонов необходимо осуществить направленное окисление боковой цепи стерина с образованием 17-кетоандростана (АД) с помощью мутантных штаммов *Mycobacterium vacca* (рис.7).

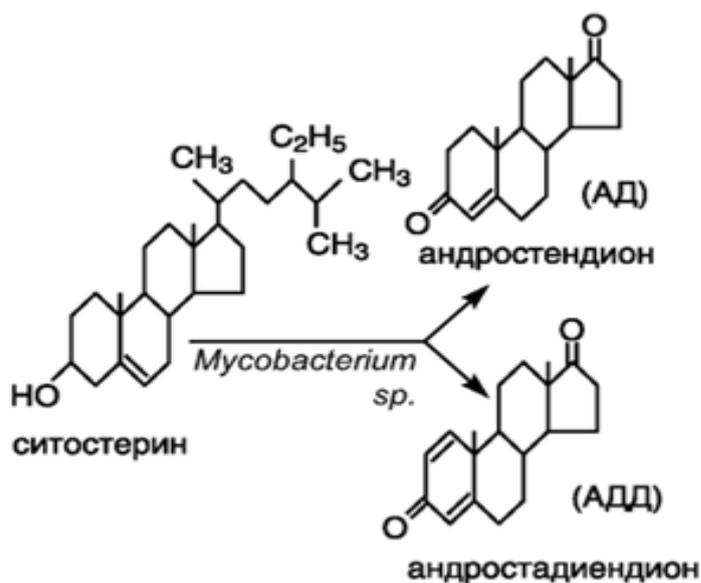


Рисунок 7. Биотрансформация β-ситостерина

Но, здесь возникает одна проблема. Так как стероиды трудно растворимы в воде, то и целевой продукт трансформации - АД практически на 99% выделяется в виде кристаллов. Поэтому культуральную жидкость необходимо отфильтровать и отделить биомассу с АД, а затем добавить ацетон и еще раз отфильтровать, для отделения АД от биомассы. Далее, ацетоновый раствор концентрируют и выделяют АД для последующей перекристаллизации, а полученный АД уже химическим способом превращают в лекарственные препараты. Это тестостерон и его эфиры: метилтестостерон, тестостерона фенилпропионат, тестостерона энантат, тестостерона ципионат и другие.

Микробиологические трансформации стероидов, используемые в промышленности.

При получении кортизона давно и успешно с высоким выходом целевого продукта применяется реакция биотрансформации - 11 α -гидроксилирование. Здесь в качестве микроорганизма трансформатора используется грибная культура *Rhizopus nigricans*. Получение 14 α -гидроксипрогестерона при помощи *Vacillus cereus* является примером гидроксилирования при помощи бактерий. 15 α -гидроксилирование осуществляется такими микроорганизмами как *Fusarium* и *Penicillium*. Применяя дегидрогенизацию стероидов с помощью бактерий и актиномицетов можно получать преднизолон из гидрокортизона с выходом до 86%. Особенно часто для этих целей используют такие микоформы как *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia* (рис.8).

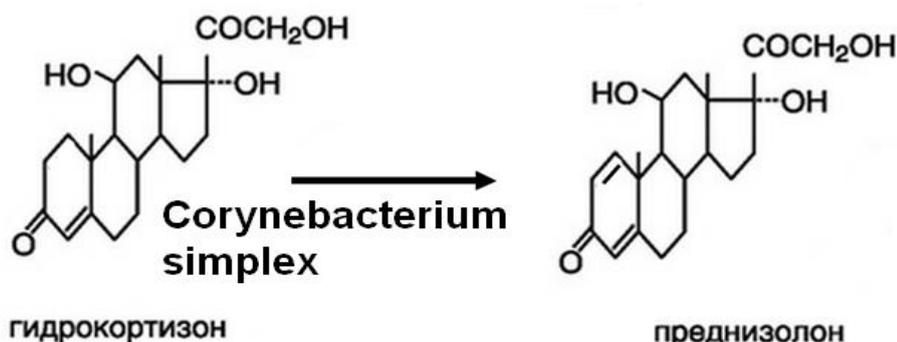


Рисунок 8. Микробиологическое дегидрирование гидрокортизона.

Окисление гидроксильной группы в кетогруппу в положении С-3 - одна из наиболее часто применяемых реакций биотрансформации с помощью таких микроорганизмов как бактерии, актиномицеты, грибы.

Использование гидролиза эфиров стероидов имеет практическое значение, так как ацилированные стероиды являются обычными промежуточными продуктами химического синтеза, в котором применяется ацильная защита функциональных групп. В этом случае также целесообразно использовать микробиологическое расщепление во избежание появления побочных продуктов химического синтеза. Например, таким путем преобразуют ацетат кортизона в кортизон.

Очень важен также и процесс отщепления боковых цепей стероидов в связи с поиском новых источников сырья.

Субстратами для проведения трансформаций могут служить и сами модифицированные стероиды. Например, ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит «вещество S Рейхштейна» (4-прегнен-17- α ,21-диол-3,20-дион), которое принято называть «вещество S». Его получают с помощью биотрансформации из моноацетата «вещества R» (21-ацетат-5-прегнен-3- β ,17 α ,21-триол-20-дион) с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum*. Процесс ферментативного превращения моноацетата «вещества R» в «вещество S. Рейхштейна» с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum* состоит из следующих стадий:

- гидролиза 21-ацетогруппы
- окисления 3 β -гидроксигруппы в 3-кетогруппу
- перемещения двойной связи от C-5 к C-4

Существующие трудности при использовании фитостероидов заключаются в необходимости селективного удаления насыщенной алифатической боковой цепи и сохранением ядра (скелета) молекулы, то есть стоит проблема отщепления боковой цепи, не затрагивая стероидное ядро. Решается эта проблема следующим образом:

1. Синтез модифицированных стероидов, ограничивающих действие микроорганизмов.
2. Инкубация стероидов в присутствии соединений, ингибирующих действие ферментов гидролаз.
3. Получение мутантных штаммов с ограниченным воздействием на стероидное ядро.

Решение проблемы плохой растворимости стероидов:

1. Применение органических растворителей: ацетона, спирта, диметилформамида.
2. Применение ультразвука, измельчение.
3. Использование образования водорастворимых форм стероидов в виде натриевых и других солей.
4. Заключение стероидов в растворимый комплекс с циклодекстрином (природные циклические олигосахариды с гидрофильно-гидрофобными свойствами внешней и внутренней поверхности).

Пути интенсификации микробиологических трансформаций.

Наиболее перспективным считают применение закрепленных (иммобилизованных) живых клеток микроорганизмов. Стероиды были одними из первых субстратов, которые удалось трансформировать с помощью иммобилизованных клеток. Наиболее мягкий способ иммобилизации - это метод включения клеток в альгинатный гель.

Преимущества этого направления:

- не нужно выделять и очищать ферменты
- более высокая активность работы клеток
- стабильность работы клеток
- не нужно выделять и очищать продукты реакции (они уже изолированы от биомассы)
- автоматизация процессов
- длительное функционирование клеток микроорганизма

3.5. Терминологическая идентификация ключевых понятий по биотехнологии стероидов.

Расшифруйте ниже представленные термины:

1. Биотрансформация.
2. Синонимы биотрансформации.
3. Циклопентанпергидрофенантрен.
4. Зоостерины.
5. Фитостерины.
6. Холестерин.
7. Эргостерин, стигмастерин, ситостерин.
8. Синоним кортизола.
9. Аналоги кортизола.
10. Кортизон по химической структуре.
11. Гидрокортизон по химической структуре.
12. АД.
13. АДД.
14. *Mycobacterium vacca*.
15. Продукты биотрансформации АД.
16. Вещество S. Рейхштейна как продукт модификации.
17. Предшественник вещества S.
18. *Corynebacterium mediolanum*.
19. *Curvularia lanata*.
20. Предшественник гидрокортизона.
21. Предшественник преднизолона.
22. *Mycobacterium globiformis*.
23. *Arthrobacter globiformis*.
24. Эпимеры.
25. Циклодекстран.

4. Тестовые задания для прохождения промежуточной аттестации

№	Задание	Эталон ответа
1.	<p>Выращивание микроорганизмов в закрытой системе, без добавления питательных веществ – это режим:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Непрерывного культивирования2. Экстремального культивирования3. Периодического культивирования4. Отъемно-доливного культивирования5. Стабильного культивирования	3
2.	<p>Кривая роста микроорганизмов не включает фазу:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Лаг-фазу роста2. Лог-фазу роста3. Линейного роста4. Стабильную фазу роста5. Отмирания культуры	4
3.	<p>Определите строго определенные свойства промышленных штаммов:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Безвредность2. Высокая скорость роста3. Отсутствие токсических веществ4. Фагоустойчивость5. Верно все	5
4.	<p>Использование бактерий в качестве продуцентов белка и витаминов в фармацевтическом производстве имеет определенные преимущества:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Высокая скорость реакции биосинтеза белка2. Относительно несложная технология3. Возможность направленного воздействия через селекцию на химический состав клеток для повышения биологической активности конечного продукта	5

	<p>4. Применение отходов пищевых и химических производств для культивирования</p> <p>5. Верно все</p>	
5.	<p>Назовите только одно общее требование к любым штаммам для культивирования бактерий:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Активное продуцирование целевого продукта 2. Идентификация штамма до вида 3. Фагоустойчивость 4. Устойчивость к высоким температурам 5.Безвредность штамма для нормальной микрофлоры кишечника 	1
6.	<p>К преимуществам метода криохранения относится:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Небольшая вероятность заражения культуры 2.Сохранение стабильности культуры 3.Долгосрочность хранения 4.Возможность использования прямого инокулята, без пересевов 5. Верно все 	5
7.	<p>Биологическая природа бактериофага:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Вирус человека или животного 2. Продукт микробной трансформации 3. Генетический маркер при скрининговых процедурах 4. Вирус бактерии 5. Не является биологическим объектом 	4
8.	<p>Определите конкретную локализацию бета-лактамаз у грамположительных бактерий:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Вне клетки 2.На рибосомах 3.На внутренней поверхности цитоплазматической мембраны 4.На полюсах клетки 	1

	5.В периплазматическом пространстве под пориновыми каналами	
9.	<p>Ослабление некоторых ограничений на использование в промышленности микроорганизмов-рекомбинантов, продуцирующих гормоны человека, стало возможным, благодаря:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Совершенствованию методов изоляции генно-инженерных рекомбинантов окружающей среды 2. Повышению квалификации персонала, работающего с рекомбинантами 3. Установленной экспериментально слабой жизнеспособности продуцента 4. Экспериментальному подтверждению потери Чужеродных генов 5. Правилам GMP 	4
10.	<p>Метод гибридизации (получение гибридом) соматических клеток по Келлеру и Мильштейну – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Слияние лимфоцитов иммунизированной антигеном мыши 2. Слияние опухолевых клеток иммунизированной антигеном мыши 3. Слияние лимфоцитов иммунизированной антигеном мыши с дрожжевой клеткой 4. Слияние лимфоцитов иммунизированной антигеном мыши с опухолевой клеткой 5. Слияние лимфоцитов иммунизированной антигеном мыши с фагами 	4
11.	<p>Отсутствие штаммов-деструкторов в аэротенках объясняется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Слабой скоростью их размножения 2. Их вытеснением представителями микрофлоры активного ила 	3

	<p>3. Потерей плазмид, где локализованы гены окислительных ферментов</p> <p>4. Проблемами техники безопасности</p> <p>5.Проблемами экологии</p>	
12.	<p>Беталактамазы у грамотрицательных бактерий находятся:</p> <p>1. Вне клетки</p> <p>2. На внутренней поверхности цитоплазматической мембраны</p> <p>3. В цитоплазматическом пространстве равномерно</p> <p>4. В периплазматическом пространстве под пориновыми каналами</p> <p>5.На рибосомах</p>	4
13.	<p>Приведите причину устойчивости микобактерий возбудителей современной туберкулезной инфекции:</p> <p>1. Компенсаторные мутации</p> <p>2. Быстрый рост</p> <p>3. Внеклеточная локализация</p> <p>4. Ослабление иммунитета организма-хозяина</p> <p>5. Повышение иммунитета организма-хозяина</p>	1
14.	<p>Назовите, что содержит паспорт производственного штамма:</p> <p>1.название штамма</p> <p>2.коллекционный номер</p> <p>3.средний уровень активности</p> <p>4.срок годности, дату выпуска</p> <p>5.верно все</p>	5
15.	<p>Активный ил, применяемый при очистке стоков биотехнологических производств, это:</p> <p>1. Сорбент</p> <p>2. Смесь сорбентов</p> <p>3.Смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами</p>	4

	<p>4. Природный комплекс микроорганизмов</p> <p>5. Штаммы-деструкторы</p>	
16.	<p>Скрининг БАВ – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Совершенствование их путем химической трансформации 2. Совершенствование их путем биотрансформации 3. Поиск и отбор природных структур 4. Полный химический синтез 5. Изменение пространственной конфигурации природных структур 	3
17.	<p>Появление множественной резистентности опухолей к противоопухолевым агентам обусловлено:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Непроницаемостью мембраны 2. Ферментативной инактивацией 3. Уменьшением сродства внутриклеточных мишеней 4. Активным выбросом 5. Сужением пориновых каналов 	4
18.	<p>Преимущества получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Несложное оборудование 2. Экономичность 3. Отсутствие дефицитного сырья 4. Снятие этических проблем 5. Отсутствие дефицитного сырья 	4
19.	<p>Особенностью пептидных факторов роста тканей является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Тканевая специфичность 2. Видовая специфичность 3. Образование вне желёз внутренней секреции 4. Трансфармационная активность 5. Каталитическая активность 	3

20.	<p>Для этапа протопластирования в клеточной инженерии наиболее подходят суспензионные культуры в фазе:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Лаг-фазе 2. Экспоненциальной 3. Фазе отмирания 4. Замедленного роста 5. Стационарной 	2
21.	<p>Подберите условие высокой стабильности протопластов при хранении:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. В холоде 2. В гипертонической среде 3. В среде с добавлением антиоксидантов 4. В анаэробных условиях 5. В среде полиэтиленгликоля (ПЭГ) 	2
22.	<p>Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Половой совместимостью 2. Половой несовместимостью 3. Совместимость не имеет существенного значения 4. Большими размерами клеток 5. Активным ростом клеток 	3
23.	<p>Образование протопластов из микробных клеток можно отслеживать с помощью:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Вискозиметрии 2. Колориметрии 3. Фазово-контрастной микроскопии 4. Электронной микроскопии 5. Спектрального анализа 	3
24.	<p>Для получения протопластов из бактериальных клеток используется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Лизоцим 2. «Улиточный фермент» 	1

	<p>3. Трипсин</p> <p>4. Папаин</p> <p>5. Химотрипсин</p>	
25.	<p>В каких случаях возможно объединение геномов клеток разных видов и родов при соматической гибридизации:</p> <p>1. Только в природных условиях</p> <p>2. Только в искусственных условиях</p> <p>3. В природных и искусственных условиях</p> <p>4. При развитии патологического процесса</p> <p>5. При стрессах</p>	2
26.	<p>Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты производится с помощью:</p> <p>1. Микроинъекции</p> <p>2. Трансформации</p> <p>3. Упаковки в липосомы</p> <p>4. Культивирования протопластов на соответствующих питательных средах</p> <p>5. Гибридом</p>	3
27.	<p>Под воздействием чего происходит ферментативный лизис оболочки при получении протопластов с нарушением синтеза пептидогликана:</p> <p>1. Лизоцима</p> <p>2. Протеиназ</p> <p>3. Целлюлаз</p> <p>4. Пептидаз</p> <p>5. Верно все</p>	1
28.	<p>Высокие концентрации каких веществ влияют на подавление синтеза клеточной стенки при получении протопластов:</p> <p>1. Глицина</p> <p>2. Метионина</p> <p>3. Треонина</p>	4

	<p>4. Пенициллина</p> <p>5. Верно все</p>	
29.	<p>Направленный мутагенез - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Использование иммобилизации 2.Селекция штаммов микроорганизмов, обладающих полезными признаками 3. Использование методов клеточной инженерии 4.Использование методов генной инженерии для внесения специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК 5.Направленное воздействие мутагенов на определенные некодирующие последовательности ДНК 	4
30.	<p>Стационарная фаза роста при периодическом культивировании микроорганизмов характеризуется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Отсутствием роста культуры 2. Синхронизацией популяции 3. Равенством скорости отмирания и скорости роста микроорганизмов в популяции 4. Выделением продуктов вторичного метаболизма 5. Постоянной скоростью утилизации энергетического субстрата 	3
31.	<p>В генной инженерии «ген-маркер» необходим для:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Включения вектора в клетки хозяина 2. Отбора колоний, образуемых клетками, в которые проник вектор 3. Включения рабочего гена в вектор 4. Экспрессии белка, как целевого продукта 5. Повышения стабильности вектора 	2
32.	<p>Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Активностью против анаэробных патогенов 2. Отсутствием нефротоксичности 	3

	<p>3. Устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды</p> <p>4. Активностью против патогенных грибов</p> <p>5. Устойчивостью к фагам</p>	
33.	<p>Причиной невозможности экспрессии гена человека в клетках прокариот является:</p> <p>1. Высокая концентрация нуклеаз</p> <p>2. Невозможность репликации плазмид</p> <p>3. Отсутствие транскрипции</p> <p>4. Невозможность сплайсинга</p> <p>5. Отсутствие транскрипции</p>	4
34.	<p>С точки зрения динамики роста продуцентов ЛС, фаза замедленного роста - это:</p> <p>1. Адаптация культуры микроорганизмов к новым условиям и практическое отсутствие митотической активности</p> <p>2. Быстрое накопление биомассы и продуктов метаболизма</p> <p>3. Прирост биомассы компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток</p> <p>4. Скорость роста культуры снижается в связи с накоплением токсичных продуктов метаболизма и расходом питательных веществ</p> <p>5. Полное истощение субстрата, скорость прироста биомассы нулевая</p>	4
35.	<p>Барботер – это устройство для:</p> <p>1. Поддачи питательной среды в ферментер</p> <p>2. Измерения уровня жидкости в ферментере</p> <p>3. Поддачи воздуха (газа) в ферментер</p> <p>4. Стерилизации ферментера</p> <p>5. Отвода тепла из ферментера</p>	3
36.	<p>Поддержание культуры продуцента на определенной стадии развития в турбидостате осуществляется за счет:</p> <p>1. Контроля рН среды</p>	4

	<p>2. Контроля за потреблением кислорода</p> <p>3. Поддержания концентрации компонентов питательной среды на определенном уровне</p> <p>4. Регулирования скорости потока жидкости</p> <p>5. Контроля температуры</p>	
37.	<p>Выживаемость лиофилизированных продуцентов зависит от:</p> <p>1. Вида штамма</p> <p>2. Специфичности вида штамма</p> <p>3. Стадии роста культуры</p> <p>4. Концентрации клеток</p> <p>5. Верно все</p>	5
38.	<p>При использовании режима непрерывного (проточного) культивирования проще поддерживать параметры процесса, потому что:</p> <p>1. В ферментере поддерживается постоянство концентрации клеток</p> <p>2. Постоянно обновляется питательная среда</p> <p>3. Происходит более интенсивное перемешивание среды</p> <p>4. Меньше вспомогательных стадий</p> <p>5. Меньше образуется пены</p>	1
39.	<p>Определите возможность получения вторичных метаболитов (антибиотиков) в режиме непрерывного культивирования:</p> <p>1. Невозможно</p> <p>2. Возможно в турбидостатическом режиме</p> <p>3. Возможно в хемостатическом режиме</p> <p>4. Возможно по схеме двухступенчатого хемостата</p> <p>5. Возможно в любом режиме</p>	4
40.	<p>Хранение продуцентов под слоем минерального масла имеет следующие преимущества:</p> <p>1. Достаточно длительное сохранение стабильности ценных</p>	5

	<p>признаков продуцентов</p> <p>2.Сокращение времени и реактивов для приготовления питательных сред и пересевов</p> <p>3.Возможность использовать одну пробирку для многократного отбора инокулята</p> <p>4. Недорогое оборудование</p> <p>5. Верно все</p>	
41.	<p>Экспоненциальная фаза с точки зрения динамики роста продуцентов лекарственных средств – это:</p> <p>1. Адаптация культура микроорганизмов к новым условиям и практическое отсутствие митотической активности</p> <p>2. Быстрое накопление биомассы и продуктов метаболизма</p> <p>3. Прирост биомассы компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток</p> <p>4. Скорость роста культуры снижается в связи с накоплением токсичных продуктов метаболизма и расходом питательных веществ</p> <p>5.Полное истощение субстрата, скорость прироста биомассы нулевая</p>	2
42.	<p>Назовите четвертую стадию в технологической схеме производства лекарственных средств:</p> <p>1. Подготовка посевного материала или инокулята</p> <p>2. Подготовка питательной среды</p> <p>3. Ферментационный процесс</p> <p>4. Очистка и концентрирование</p> <p>5. Получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы</p>	4
43.	<p>«Слабыми точками» ферментера называют:</p> <p>1. Элементы конструкции, наиболее подверженные коррозии</p> <p>2. Элементы конструкции, в которых возможна разгерметизация</p>	3

	<p>3. Трудно стерилизуемые элементы конструкции</p> <p>4. Области ферментера, в которые затруднена доставка кислорода</p> <p>5. Области ферментера, в которых нарушен теплообмен</p>	
44.	<p>Третья стадия в цепи реакций полуколичественного метода экспресс-анализа на бумаге (многослойные целлюлозные полоски) при определении теофиллина – это:</p> <p>1. Реакция пероксида водорода с пероксидазой и донором протонов</p> <p>2. Присоединение конъюгата с ФАД к глюкозо-оксидазе с последующей активацией ее и образованием пероксида водорода</p> <p>3. Вытеснение конъюгата (теофиллин-ФАД) из комплекса его с антителами свободным теофиллином</p> <p>4. Измерение интенсивности окрашивания</p> <p>5. Измерение удельной активности комплекса</p>	1
45.	<p>Применение каких иммунобиопрепаратов и методов вызывает супрессию иммунного ответа, если воздействие неспецифическое:</p> <p>1. Неспецифическая гемосорбция и иммуноплазмофорез</p> <p>2. Специфическая гемосорбция и иммуноплазмофорез</p> <p>3. Иммунотоксины, антиидиотипические антитела (мишени для аутоантител), моноклональные антитела против цитокинов</p> <p>4. Рекомбинантные антигены, толерогены</p> <p>5. Рекомбинантные интерлейкины, интерфероны</p>	1
46.	<p>С точки зрения динамики роста продуцентов лекарственных средств, фаза аутолиза – это:</p> <p>1. Адаптация культура микроорганизмов к новым условиям и практическое отсутствие митотической активности</p> <p>2. Быстрое накопление биомассы и продуктов метаболизма</p> <p>3. Прирост биомассы компенсируется скоростью гибели и</p>	5

	<p>лизиса клеток</p> <p>4.Скорость роста культуры снижается в связи с накоплением токсичных продуктов метаболизма и расходом питательных веществ</p> <p>5.Полное истощение субстрата, скорость прироста биомассы нулевая</p>	
47.	<p>При биотехнологическом получении витамина В₁₂ требуется экстрагирование в течение часа с помощью:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Дистиллированной воды 2. Слабо подкисленной воды 3. Сильно подкисленной воды 4. Щелочной воды 5. Водного раствора аммиака 	2
48.	<p>Наиболее оптимальный способ разрушения клеток в генной инженерии:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Механический 2. Термический 3. Химико-ферментативный 4. Осмотический шок 5. Ультразвуковой 	3
49.	<p>Возможность движения рекомбинантной ДНК в камере электрофореза осуществляет:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Источник тока 2. Электрофоретическая камера 3. Пластины 4. Гребенки 5. Ультрафиолетовые лампы 	1
50.	<p>Емкостью для заполнения электролитом при электрофорезе является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Источник тока 2. Электрофоретическая камера 3. Пластины 	2

	<p>4. Гребенки</p> <p>5. Ультрафиолетовые лампы</p>	
51.	<p>Третья стадия в общей технологической схеме производства лекарственных средств - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Подготовка посевного материала или инокулята 2. Подготовка питательной среды 3. Ферментационный процесс 4. Очистка и концентрирование 5. Получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы 	3
52.	<p>Идентификацию рекомбинантной ДНК можно провести с помощью:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Источника тока 2. Электрофоретической камеры 3. Пластины 4. Гребенки 5. Ультрафиолетовой лампы 	5
53.	<p>Технология, основанная на иммобилизации биообъекта, уменьшает наличие в лекарственном препарате следующих примесей:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Следовых количеств тяжелых металлов 2. Белков 3. Механических частиц 4. Органических растворителей 5. Пирогенных веществ 	2
54.	<p>Использование бактерий в качестве продуцентов белка и витаминов в фармацевтическом производстве имеет определенные преимущества - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая скорость реакции биосинтеза белка 2. Относительно несложная технология 3. Возможность направленного воздействия через селекцию на химический состав клеток для повышения 	5

	<p>биологической активности конечного продукта</p> <p>4. Применение отходов пищевых и химических производств для культивирования</p> <p>5. Верно все</p>	
55.	<p>Определите, в соответствии с требованиями GMP, кто может быть директором (главным инженером) фармацевтического предприятия:</p> <p>1. Инженер-экономист</p> <p>2. Юрист</p> <p>3. Провизор</p> <p>4. Врач</p> <p>5. Экономист с юридическим образованием</p>	3
56.	<p>Выберите метод стерилизации воздуха при проведении ферментации:</p> <p>1. Нагревание</p> <p>2. Фильтрование</p> <p>3. УФ-облучение</p> <p>4. Радиация в малых дозах</p> <p>5. Антибиотическими веществами</p>	2
57.	<p>Правила GMP регламентируют производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:</p> <p>1. Биологических препаратов на всех стадиях процесса</p> <p>2. Только на стадии выделения продукта</p> <p>3. Только для препаратов, получаемых с использованием рекомбинантных штаммов</p> <p>4. Вакцин БЦЖ и работы с живыми микроорганизмами</p> <p>5. Требование неактуально для биотехнологических препаратов</p>	4
58.	<p>Ферментеры, используемые в биотехнологическом производстве, наиболее подходят для проведения:</p> <p>1. Аэробных процессов</p> <p>2. Анаэробных процессов</p>	1

	<p>3. Как аэробных, так и анаэробных</p> <p>4. Процессов биосинтеза вторичных метаболитов</p> <p>5. Процессов масштабирования выращивания микроорганизмов</p>	
59.	<p>Под стерилизацией в биотехнологии понимают:</p> <p>1. выделение бактерий из природного источника</p> <p>2. уничтожение патогенных микроорганизмов</p> <p>3. уничтожение всех микроорганизмов и их покоящихся форм</p> <p>4. уничтожение спор микроорганизмов</p> <p>5. создание условий, препятствующих размножению продуцентов</p>	3
60.	<p>Поддержание культуры продуцента на определенной стадии развития в хемостате осуществляется за счет:</p> <p>1. Регулирования скорости подачи питательной среды</p> <p>2. Поддержания концентрации одного из компонентов питательной среды на определенном уровне</p> <p>3. Изменения интенсивности перемешивания</p> <p>4. Изменения температуры</p> <p>5. Изменения скорости подачи воздуха</p>	2
61.	<p>Что относится к завершающей стадии в общей технологической схеме производства лекарственных средств:</p> <p>1. Подготовка посевного материала или инокулята</p> <p>2. Подготовка питательной среды</p> <p>3. Ферментационный процесс</p> <p>4. Очистка и концентрирование</p> <p>5. Получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы</p>	5
62.	<p>Ко второй стадии в цепи реакций полуколичественного метода экспресс-анализа на бумаге (многослойные</p>	2

	<p>целлюлозные полоски) при определении теофиллина относится:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Реакция пероксида водорода с пероксидазой и донором протонов 2. Присоединение конъюгата с ФАД к глюкозо-оксидазе с последующей активацией ее и образованием пероксида водорода 3. Вытеснение конъюгата (теофиллин-ФАД) из комплекса его с антителами свободным теофиллином 4. Измерение интенсивности окрашивания 5. Измерение удельной активности комплекса 	
63.	<p>Что относится к начальной стадии в общей технологической схеме производства лекарственных средств:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Подготовка посевного материала или инокулята 2. Подготовка питательной среды 3. Ферментационный процесс 4. Очистка и концентрирование 5. Получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы 	1
64.	<p>С позиции динамики роста продуцентов лекарственных средств латентная фаза – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Адаптация культуры к новым условиям, заметного роста культуры нет 2. Быстрое накопление биомассы и продуктов метаболизма 3. Прирост биомассы компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток 4. Скорость роста культуры снижается в связи с накоплением токсичных продуктов метаболизма и расходом питательных веществ 5. Полное истощение субстрата, скорость прироста биомассы нулевая 	1

65.	<p>Назовите, что представляет третью стадию по технологической схеме производства лекарственных средств:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Подготовка посевного материала или инокулята 2. Подготовка питательной среды 3. Ферментационный процесс 4. Очистка и концентрирование 5. Получение конечной субстанции или готовой лекарственной формы 	3
66.	<p>В схеме биотехнологического производства лекарственных средств вторая стадия включает процесс:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Подготовки посевного материала или инокулята 2.Подготовки питательной среды 3.Ферментационный процесс 4.Очистки и концентрирования 5.Получения конечной субстанции или готовой лекарственной формы 	2
67.	<p>При гель-фильтрации последними элюируются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Низкомолекулярные соединения 2. Крупные белки и мелкие пептиды 3. Только крупные белки 4. Только мелкие пептиды 5. Высокмолекулярные соединения 	1
68.	<p>Укажите первую стадию в цепи реакций полуколичественного метода экспресс-анализа на бумаге (многослойные целлюлозные полоски) при определении теофиллина – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Реакция пероксида водорода с пероксидазой и донором протонов 2. Присоединение конъюгата с ФАД к глюкозо-оксидазе с последующей активацией ее и образованием пероксида водорода 	3

	<p>3. Вытеснение конъюгата (теофиллин-ФАД) из комплекса с антителами свободным теофиллином</p> <p>4. Измерение интенсивности окрашивания</p> <p>5. Измерение удельной активности комплекса</p>	
69.	<p>Определите, каким методом анализа осуществляется контроль концентрации жизнеспособных клеток:</p> <p>1. Колориметрически и подсчетом выросших колоний</p> <p>2. Кислотно-основным титрованием и подсчетом выросших колоний</p> <p>3. Окислительно-восстановительным титрованием и подсчетом выросших колоний</p> <p>4. Осадительным титрованием и подсчетом выросших колоний</p> <p>5. Верно все</p>	3
70.	<p>Укажите метод определения титруемой кислотности культуральной среды:</p> <p>1. Кислотно-основное титрование</p> <p>2. Окислительно-восстановительное титрование</p> <p>3. Комплексонометрическое титрование</p> <p>4. Потенциометрическое титрование</p> <p>5. Верно все</p>	1
71.	<p>К преимуществам мембран, используемых в биотехнологии, относится:</p> <p>1. Очистка и концентрирование происходит без изменения агрегатного состояния лекарственных соединений</p> <p>2. Конечный продукт не подвергается тепловым и химическим воздействиям</p> <p>3. Механическое и гидродинамическое воздействие на биологический материал незначительно</p> <p>4. Обеспечение герметичности и асептики</p> <p>5. Верно все</p>	5

72.	<p>Что представляет заключительная (последняя) стадия в цепи реакций полуколичественного метода экспресс-анализа на бумаге (многослойные целлюлозные полоски) при определении теofilлина – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Реакция пероксида водорода с пероксидазой и донором протонов 2. Присоединение конъюгата с ФАД к глюкозо-оксидазе с последующей активацией ее и образованием пероксида водорода 3. Вытеснение конъюгата (теofilлин-ФАД) из комплекса его с антителами свободным теofilлином 4. Измерение интенсивности окрашивания 5. Измерение удельной активности комплекса 	4
73.	<p>При обращенно-фазовой хроматографии, назовите подвижную фазу, используемую в этом случае:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Полярная и градиент с понижением полярности 2.Неполярная и градиент с понижением полярности 3.Полярная и градиент с повышением полярности 4.Неполярная и градиент с повышением полярности 5.Верно все 	1
74.	<p>Твердофазная экстракция позволяет:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Отделить осадок от супернатанта 2. Разделить вещества по молекулярным массам 3.Сконцентрировать белковый раствор 3. Освободиться от примесей 4. Верно все 	3
75.	<p>При гель-фильтрации первыми будут элюироваться:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.крупные белки и мелкие пептиды 2.только крупные белки 3.только мелкие пептиды 4.высокомолекулярные соединения 5.низкомолекулярные соединения 	4

76.	<p>Назовите условия повышения качества фильтрации в биосинтезе:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Обработка культуральной жидкости электролитами 2. Тепловая коагуляция 3. Фильтрующие наполнители 4. Кислотная коагуляция 5. Верно все 	5
77.	<p>Очистка жидких отходов биотехнологического производства использует биоценоз «активный ил», в состав которого входят микроорганизмы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pseudomonas 2. Bacillus 3. Bacterium, Pseudomonas, Bacillus 4. Bacterium, Pseudomonas 5. Bacterium, Bacillus 	3
78.	<p>В какой зоне чистых помещений должен осуществляться асептический разлив инъекционных биотехнологических препаратов:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. В зоне типа А 2. В зоне типа В 3. В зоне типа С 4. В зоне типа D 5. В боксе биологической безопасности 	1
79.	<p>При турбидостатическом режиме культивирования о концентрации клеток продуцента судят по:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Скорости потребления кислорода 2. Интенсивности выделения углекислого газа 3. Интенсивности тепловыделения 4. Мутности выходящего потока культуральной жидкости 5. Изменению рН культуральной жидкости 	4
80.	<p>Ретроингибирование конечным продуктом при биосинтезе биологически активных веществ – это:</p>	1

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подавление начального фермента в метаболической цепи 2. Подавление последнего фермента в метаболической цепи 3. Подавление всех ферментов в метаболической цепи 4. Активизация ферментов в метаболизме клеток 5. Пролонгация биосинтеза. 	
81.	<p>Укажите фибринолитический фермент микробиологического синтеза, эффективный при лечении тромбозов:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Стрептокиназа 2. α-амилаза 3. Солизим 4. Галактозидаза 5. Трипсин 	1
82.	<p>Укажите окислительно-восстановительные биокатализаторы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Оксиредуктазы 2. Трансферазы 3. Гидролазы 4. Лиазы 5. Изомеразы. 	1
83.	<p>Укажите биокатализаторы процесса гидролиза:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Оксиредуктазы 2. Трансферазы 3. Гидролазы 4. Лиазы 5. Изомеразы 	3
84.	<p>Мультиферментный комплекс состоит из:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ферментов, катализирующих синтез первичного или вторичного метаболита 2. Ферментных белков, выделяемых из клетки путем экстракции и осаждения 	1

	<p>3. Ферментов клеточной мембраны</p> <p>4. Экзо-и эндопротеаз</p> <p>5. Транспептидаз</p>	
85.	<p>Пенициллинацилаза используется при:</p> <p>1. Получении полусинтетических пенициллинов</p> <p>2. Проверке заводских серий пенициллина на стерильность</p> <p>3. Оценке эффективности пенициллиновых структур против резистентных бактерий</p> <p>4. Снятии аллергических реакций на пенициллин</p> <p>5. Снятии пирогенных реакций</p>	1
86.	<p>Фермент, отвечающий за устойчивость патогенных бактерий к пенициллинам:</p> <p>1. В-лактамаза</p> <p>2. Стрептокиназа</p> <p>3. Уреаза</p> <p>4. В-галактозидаза</p> <p>5. Пенициллинацилаза</p>	1
87.	<p>К специфическим белкам-ферментам относятся:</p> <p>1. Гидролазы</p> <p>2. Оксиредуктазы</p> <p>3. Трансферазы</p> <p>4. Лиазы</p> <p>5. Верно все</p>	5
88.	<p>Рибозимы – это:</p> <p>1. Компоненты рибосом</p> <p>2. Ферменты- нуклеопротеиды</p> <p>3. Ферменты, осуществляющие синтез и превращения рибозы</p> <p>4. Специфические молекулы РНК, обладающие каталитической активностью по отношению к другим молекулам рнк</p>	4

	5. Ферменты кодирующие синтез РНК	
89.	Фермент, расщепляющий крахмал до глюкозы, используемый при лечении поджелудочной железы: 1. Амилаза 2. Солизим 3. Террилитин 4. Стрептокиназа 5. Бетагалактозидаза	1
90.	Требования к ферментам-маркерам: 1. Высокая активность и стабильность 2. Простота метода определения субстрата или продукта 3. Сохранение активности и стабильности при модификации 4. Высокая чувствительность 5. Верно все	5
91.	Липолитический фермент, гидролизующий жиры, применяемый при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта: 1. Солизим 2. Амилаза 3. Террилитин 4. Стрептокиназа 5. Бетагалактозидаза	1
92.	Фермент пенициллинацилаза катализирует: 1. Расщепление беталактамного кольца 2. Расщепление тиазолидинового кольца 3. Отщепление бокового радикала при с ₆ 4. Деметилирование тиазолидинового кольца 5. Метилирование тиазолидинового кольца	3
93.	Что отличает химическое производство аминокислот от микробиологического?	5

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Исходное сырье 2. Температура, время процесса 3. Получение рацематов 4. Дорогостоящие катализаторы 5. Верно все 	
94.	<p>Для каких лекарственных средств на основе аминокислот химический синтез является более рациональным, чем микробиологический:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Лейцин 2. Изолейцин 3. Глицин 4. Фенилаланин 5. Лизин 	3
95.	<p>Выберите биообъект для биотехнологического производства треонина:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Bacillus subtilis</i> 2. <i>Escherichia coli</i> 3. <i>Corynebacterium glutamicum</i> 4. <i>Xanthomonas</i> sp. 5. <i>Pseudomonas</i> sp. 	2
96.	<p>Выберите биообъект для биотехнологического производства лизина:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Bacillus subtilis</i> 2. <i>Escherichia coli</i> 3. <i>Corynebacterium glutamicum</i> 4. <i>Xanthomonas</i> sp. 5. <i>Pseudomonas</i> sp. 	3
97.	<p>Укажите регуляторный элемент, воспринимающий сигнал обратной связи в случае проявления механизма ретроингибирования:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Промотор 2. Информационная рнк 	4

	<p>3. Структурные белки</p> <p>4. Аттенуатор</p> <p>5. Белок-репрессор</p>	
98.	<p>Причина включения механизма регуляции биосинтеза аминокислот репрессии в клетке <i>Escherichia coli</i>:</p> <p>1. Наличие избыточного количества треонина в клетке</p> <p>2. Превращение части треонина в изолейцин</p> <p>3. Накопление треонина и изолейцина одновременно</p> <p>4. Взаимодействие треонина с аттенуатором и терминация процесса транскрипции белка фермента</p> <p>5. Верно все</p>	3
99.	<p>Максимально высокая скорость синтеза лизина достигается:</p> <p>1. Нарушением молекулярных механизмов регуляции биосинтеза клетки</p> <p>2. Оптимальными условиями выращивания биомассы</p> <p>3. Дробной подачей и поддержанием концентрации источников углерода, аммонийного азота, минеральных солей, ростовых факторов в процессе ферментации</p> <p>4. рН-статированием в процессе ферментации</p> <p>5. Верно все</p>	5
100.	<p>В процессе ферментации при производстве треонина биотехнологическим методом необходимо поддерживать оптимальные значения рН среды, что делается с помощью:</p> <p>1. Аммиака</p> <p>2. Аммиачной воды</p> <p>3. Углеводов</p> <p>4. Смесью аммиачной воды и углеводов</p> <p>5. Смесью аммиака и углеводов</p>	4
101.	<p>Ферментация в эффективном производстве аминокислот должна проводиться в условиях:</p> <p>1. Добавления предшественников</p> <p>2. Интенсивной аэрации</p>	5

	<p>3. Активного перемешивания</p> <p>4. Дробной подачи компонентов питательной среды</p> <p>5. Верно все</p>	
102.	<p>Синтез целевой аминокислоты может прекратиться из-за воздействия на продуцент:</p> <p>1. Токсических метаболитов биосинтеза в клетке</p> <p>2. Изменением кислотности среды (рН)</p> <p>3. Отсутствием ростовых факторов</p> <p>4. Недостаточностью аэрации процесса</p> <p>5. Верно все</p>	5
103.	<p>В промышленности аминоксусную кислоту (глицин) получают методом:</p> <p>1. Химическим</p> <p>2. Биологическим</p> <p>3. Химико-энзиматическим</p> <p>4. Микробиологическим</p> <p>5. Верно все</p>	1
104.	<p>Рабочий цикл ферментации аминокислот зависит от:</p> <p>1. От «фоновой» концентрации источников углерода</p> <p>2. Продуктивности биомассы</p> <p>3. Использования субстрата</p> <p>4. Наличия в среде токсических метаболитов</p> <p>5. Верно все</p>	5
105.	<p>В случае биосинтеза какой аминокислоты процесс имеет 2-х фазный характер:</p> <p>1. Треонина</p> <p>2. Валина</p> <p>3. Лизина</p> <p>4. Изолейцина</p> <p>5. Верно все</p>	3

106.	<p>В промышленном синтезе l-аскорбиновой кислоты с помощью бактерий осуществляют превращение:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. D-сорбитола в L-сорбозу 2. D-глюкозы в D-сорбитол 3. L-сорбозы в 2-кето-L-гулоновую кислоту 4. 2-кето-L-гулоновой кислоты в L-аскорбиновую кислоту 5. Глюкозы во фруктозу 	1
107.	<p>Какой из представленных ниже препаратов на основе аминокислот применяется в терапии нервных и психических заболеваний:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Глутамин 2. Цистеин 3. Метионин 4. Глицин 5. Церебролизин 	1
108.	<p>Какой препарат на основе аминокислот используется как регулятор процессов регенерации в головном мозге (инсульт, ишемия):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Цистеин 2. Метионин 3. Глицин 4. Церебролизин 5. Аланин 	4
109.	<p>Что из ниже представленного можно отнести к космоцевтическим препаратам на основе аминокислот:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Глицин 2. Метионин 3. Эмбриобласт 4. Румалон 5. Раверон 	3
110.	<p>Лекарственный препарат на основе аминокислот, регулирующий метаболические процессы в головном мозге:</p>	1

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Глицин 2. Глутамин 3. Метионин 4. Цистеин 5. Церебролизин 	
111.	<p>Выберите наиболее дешевый и доступный источник из класса фитостеринов для производства стероидных гормонов как ЛС:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Диосгенин 2. Соласодин 3. Стилгмастерин 4. Ситостерин 5. Эргостерин 	4
112.	<p>Укажите, какие ЛС можно получить из андростендиона (АД) с помощью химических модификаций:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Тестостерон 2. Метилтестостерон 3. Оксипрогестерон 4. Спиринолактон 5. Верно все 	5
113.	<p>В медицинской практике стероидные гормоны применяются в качестве лекарственных средств биотехнологического производства как:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Противовоспалительные 2. Диуретические 3. Анаболические 4. Противораковые 5. Верно все 	5
114.	<p>Общей чертой всех процессов микробиологической трансформации является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Увеличение молекулярной массы вещества 2. Активация молекул 	3

	<p>3. Изменение молекулярной структуры веществ</p> <p>4. Синтез молекул «de novo»</p> <p>5. Реакции комплексообразования</p>	
115.	<p>Отличительной особенностью кортикостероидов является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Наличие кислородной группы у 3-го углеродного атома 2. Наличие кислородной группы у 11-го углеродного атома при C-17 3. Наличие двойной связи между атомами C-4 и C-5 4. Наличие двойной связи между атомами C-5 и C-6 5. Наличие гидроксизамещенной ацетильной группы при C-17 	1
116.	<p>Фармакологическую активность для большинства стероидных гормонов обуславливает присутствие гидроксильных групп в ядре цикlopentanпергидрофенантрена в следующих положениях:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. C-3, C-11, C-16, C-17 2. C-3 3. C-3, C-11, C-16 4. C-3, C-16, C-17 5. C-3, C-11 	1
117.	<p>Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является прогестерон, а продуктом – 11-α-гидроксипрогестерон:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rhizopus nigricans</i>, 11-α-гидроксилирование 2. <i>Culvalaria lunata</i>, 11-β-гидроксилирование 3. <i>Streptomyces roseochromogenus</i>, 16-α-гидроксилирование 4. <i>Arthrobacter simplex</i>, 1,2-дегидрирование 5. <i>Mycobacterium vaca</i>, окисление боковой цепи стерина 	1

118.	<p>Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является вещество S Рейхштейна, а продуктом – гидрокортизон:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rhizopus nigricans</i>, 11-α-гидроксилирование 2. <i>Mycobacterium vaca</i>, окисление боковой цепи стерина 3. <i>Streptomyces roseochromogenus</i>, 16-α-гидроксилирование 4. <i>Culvalaria lunata</i>, 11-β-гидроксилирование 5. <i>Arthrobacter simplex</i>, 1,2-дегидрирование 	4
119.	<p>Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является 9-α-фторкортизол, а продуктом – 9-α-фтор-16-α-гидрокси кортизол:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rhizopus nigricans</i>, 11-α-гидроксилирование 2. <i>Culvalaria lunata</i>, 11-β-гидроксилирование 3. <i>Streptomyces roseochromogenus</i>, 16-α-гидроксилирование 4. <i>Arthrobacter simplex</i>, 1,2-дегидрирование 5. <i>Mycobacterium vaca</i>, окисление боковой цепи стерина 	3
120.	<p>Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является гидрокортизон, а продуктом – преднизолон:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rhizopus nigricans</i>, 11-α-гидроксилирование 2. <i>Culvalaria lunata</i>, 11-β-гидроксилирование 3. <i>Streptomyces roseochromogenus</i>, 16-α-гидроксилирование 4. <i>Arthrobacter simplex</i>, 1,2-дегидрирование 5. <i>Mycobacterium vaca</i>, окисление боковой цепи стерина 	4

121.	<p>Выберите микробиологическую трансформацию с указанием применяемого микроорганизма и соответствующей ферментативной реакции, если субстратом является β-ситостерин, а продуктом – андростендион или андростадиендион:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Rhizopus nigricans</i>, 11-α-гидроксилирование 2. <i>Culvalaria lunata</i>, 11-β-гидроксилирование 3. <i>Streptomyces roseochromogenus</i>, 16-α-гидроксилирование 4. <i>Arthrobacter simplex</i>, 1,2-дегидрирование 5. <i>Mycobacterium vaca</i>, окисление боковой цепи стерина 	5
122.	<p>Выделение продукта трансформации гидрокортизона состоит в последовательных стадиях:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Очистка, фильтрование, экстракция, сепарация 2. Сепарация, экстракция, фильтрование, очистка 3. Экстракция, сепарация, фильтрование, очистка 4. Фильтрование, сепарация, экстракция, очистка 5. Сепарация, экстракция, очистка 	2
123.	<p>Наиболее перспективным направлением для снижения себестоимости и повышения качества целевого продукта в биокатализе является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Химические модификации субстрата 2. Повышение селективности микроорганизма-трансформатора 3. Повышение растворимости стеринов 4. Индуцирование растущей культуры 5. Иммобилизация живых клеток микроорганизма-трансформатора 	5
124.	<p>Увеличение выхода целевого продукта при биотрансформации стероидов достигается при:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Увеличении концентрации стероидного субстрата в ферментационной среде 	1

	<ol style="list-style-type: none"> 2. Увеличении интенсивности перемешивания 3. Увеличении интенсивности аэрации 4. Повышении температуры ферментации 5. Исключении микробной контаминации 	
125.	<p>Основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией состоит в:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Избирательности воздействия на определенные функциональные группы стероида 2. Доступности реагентов 3. Сокращении времени процесса 4. Получении принципиально новых соединений 5. Синтезе целевого продукта «de novo» 	1
126.	<p>Каллусные культуры нуждаются в освещении для:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Для образования вторичных метаболитов 2. Для осуществления в клетках процессов фотосинтеза 3. Для осуществления процессов клеточной дифференциации 4. Для инициации процессов деления клеток 5. Для инициации процессов морфогенеза 	1
127.	<p>Питательные среды для культур растительных клеток отличаются от питательных сред для микроорганизмов и соматических клеток обязательным наличием:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Углеводов 2. Фитогормонов 3. Соединений азота и фосфора 4. Сыворотки из эмбрионов телят 5. Витаминов 	2
128.	<p>Растительная клетка отличается от соматической только:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Длительностью жизненного цикла, строением и составом клеточной стенки, размерами, наличием вакуоли 	1

	<ol style="list-style-type: none"> 2. Длительностью жизненного цикла, строением и составом клеточной стенки 3. Размерами, наличием вакуоли 4. Строением и составом клеточной стенки 5. Наличием вакуоли 	
129.	<p>Высокая стабильность протопластов достигается при хранении:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. В гипертонической среде 2. В холоде 3. В среде с добавлением антиоксидантов 4. В анаэробных условиях 5. В среде полиэтиленгликоля (ПЭГ) 	1
130.	<p>Что отличает растительные клетки от клеток микроорганизмов:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Размеры клетки 2. Наличие вакуоли 3. В суспензионных культурах клетки имеют агрегаты различных размеров 4. Наличие целлюлозной оболочки 5. Верно все 	5
131.	<p>Тотипотентность растительной клетки – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Физиологический потенциал клетки 2. Генетический потенциал клетки 3. Способность воспроизводства на основе генетического потенциала клетки 4. Способность клетки к метаболизму 5. Способность клетки к защите от внешних неблагоприятных факторов 	3
132.	<p>Для стимуляции процесса синтеза и длительного использования биомассы при получении вторичных метаболитов растительных клеток и тканей необходимы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Нитраты 	5

	<ul style="list-style-type: none"> 2. Ионы аммония 3. Соли калия 4. Соли фосфора 5. Предшественники биосинтеза 	
133.	<p>Укажите активную фазу роста каллусных клеток и ткани:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Лаг-фаза 2. Фаза начала митотической активности 3. Экспоненциальная фаза 4. Стационарная фаза 5. Фаза автолиза 	3
134.	<p>Укажите фазу снижения деления клеток:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Лаг-фаза 2. Фаза начала митотической активности 3. Экспоненциальная фаза 4. Стационарная фаза 5. Фаза автолиза 	4
135.	<p>Для иммобилизации клеток каллусной культуры <i>Digitalis lanata</i> используют носители:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Альгинат кальция 2. Агарозу 3. Порошковый металл 4. Полиуретан 5. Верно все 	5
136.	<p>Асептика в разделе культивирования растительных клеток при биосинтезе вторичных метаболитов как ЛС включает стерилизацию воздуха, используя:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Фильтрация 2. Уф-облучение 3. Антисептики 4. Антибиотики 5. Верно все 	1

137.	<p>Цикл культивирования растительных клеток, участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов, в технологии получения биомассы определяется стадией:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Приготовление питательной среды 2. Стерилизация питательной среды 3. Посев ткани на питательную среду 4. Выращивание биомассы 5. Съем сырой массы и высушивание 	4
138.	<p>Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Половой совместимостью 2. Половой несовместимостью 3. Совместимость не имеет существенного значения 4. Большими размерами клеток 5. Активным ростом клеток 	3
139.	<p>Для протопластирования наиболее подходят суспензионные культуры:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. В лаг-фазе 2. В стационарной фазе 3. В экспоненциальной фазе 4. В фазе замедленного роста 5. В фазе отмирания 	3
140.	<p>Укажите название растения, с помощью которого можно получать сердечные вещества, «карденолиды» на примере получения дигоксина с использованием биотрансформации:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Atropa belladonna</i> 2. <i>Rauvolfia serpentina</i> 3. <i>Digitalis lanata</i> 4. <i>Panax ginseng</i> 5. <i>Dioscorea deltoidea</i> 	3

141.	<p>В клиниках в лечебной практике кожных заболеваний используют ЛС на основе каллусных и суспензионных культур, из нижеперечисленного это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Панаксозиды 2. Диосгенин 3. Берберин 4. Шиконин 5. Дигоксин 	4
142.	<p>В клиниках в лечебной практике сердечно-сосудистых заболеваний используют ЛС на основе каллусных и суспензионных культур, из нижеперечисленного это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Панаксозиды 2. Диосгенин 3. Берберин 4. Шиконин 5. Дигоксин 	5
143.	<p>В клиниках в лечебной практике кишечных расстройств используют ЛС на основе каллусных и суспензионных культур, из нижеперечисленного это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Панаксозиды 2. Диосгенин 3. Берберин 4. Шиконин 5. Дигоксин 	3
144.	<p>В клиниках в лечебной практике для усиления иммунитета в качестве адаптогена используют ЛС на основе каллусных и суспензионных культур, из нижеперечисленного это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Панаксозиды 2. Диосгенин 3. Берберин 4. Шиконин 5. Дигоксин 	1

145.	<p>В лечебной практике как противозачаточное используют ЛС на основе каллусных и суспензионных культур, из нижеперечисленного это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Панаксозиды 2. Диосгенин 3. Берберин 4. Шиконин 5. Дигоксин 	2
146.	<p>Превращение карденолида дигитоксина в менее токсичный дигоксин осуществляется культурой клеток:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Digitalis lanata</i> 2. <i>Acremonium chrysogenum</i> 3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4. <i>Tolyrocladium inflatum</i> 5. <i>Penicillium chrysogenum</i> 	1
147.	<p>Применение нормофлоров может предупредить развитие атеросклероза посредством:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Метаболизма холестерина 2. Усиления иммунитета 3. Поддержания иммунитета 4. Расщепления лактозы 5. Модификации канцерогенов 	1
148.	<p>Выберите начальную (первую) стадию процесса получения нормофлоров на производстве:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Подготовка питательной среды 2. Смешивание концентрата бактерий с наполнителями 3. Культивирование бактерий 4. Отделение биомассы 5. Фасовка 	1
149.	<p>Укажите особые требования к штаммам нормофлоров с учетом их использования в биотехнологии:</p>	1

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Выдерживать глубокое замораживание и лиофильное высушивание 2. Быть активными и не токсичными 3. Быть активными и фагоустойчивыми 4. Быть активными, непатогенными 5. Верно все 	
150.	<p>Что не является синонимом понятия «нормофлоры»:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Пробиотики 2. Эубиотики 3. Лактобактерии 4. Микробиотики 5. Верно все 	3
151.	<p>Дисбактериоз может являться следствием:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Изменения привычной среды обитания 2. Изменения характера питания 3. Стрессовых ситуаций 4. Широкого применения антибиотикотерапии 5. Верно все 	5
152.	<p>Препарат «Колибактерин» создан на основе штамма:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. E.coli 2. Bifidobacterium bifidum 3. Lactobacillus 4. Proteus 5. Bacillus brevis 	1
153.	<p>Активная кислотность жизнеспособных клеток препаратов нормофлор определяется методом:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Потенциометрического титрования 2. Кислотно-основного титрования 3. Окислительно-восстановительного титрования 4. Осадительного титрования 5. Верно все 	1

154.	<p>Укажите самых многочисленных обитателей кишечника в отсутствие какой-либо патологии:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Пептококки 2. Кишечная палочка 3. Стафилококки 4. Бифидобактерии 5. Стрептококки 	4
155.	<p>Механизм действия молочно-кислых бактерий при подавлении патогенных и гнилостных бактерий сводится к:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Понижению рН и адгезии на эпителии кишечника 2. Повышению рН и адгезии на эпителии кишечника 3. Только понижению рН 4. Только адгезии на эпителии кишечника 5. Нейтрализации токсических веществ 	1
156.	<p>Диарея в оптимальном варианте поддается лечению:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Антибиотиками 2. Бифидумбактерином 3. Сульфамидами 4. Ферментными препаратами 5. Верно все 	2
157.	<p>Выберите вторую стадию процесса получения нормофлоров на производстве:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Культивирование бактерий 2. Смешивание концентрата бактерий с наполнителями 3. Подготовка питательной среды 4. Отделение биомассы 5. Фасовка 	1
158.	<p>Выберите четвертую стадию процесса получения нормофлоров на производстве:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Культивирование бактерий 2. Подготовка питательной среды 3. Смешивание концентрата бактерий с наполнителями 	3

	<p>4. Отделение биомассы</p> <p>5. Фасовка</p>	
159.	<p>Молочнокислые бактерии могут оказывать положительное действие путем влияния:</p> <p>1. Одновременно на расщепление лактозы, на усиление неспецифического иммунитета и на метаболизм холестерина</p> <p>2. Только на расщепление лактозы</p> <p>3. Только на усиление неспецифического иммунитета</p> <p>4. Только на метаболизм холестерина</p> <p>5. Одновременно на расщепление лактозы и на усиление неспецифического иммунитета</p>	1
160.	<p>К нормальной или резидентской микрофлоре кишечника относятся:</p> <p>1. Молочнокислые бактерии</p> <p>2. Энтеробактерии</p> <p>3. Стафилококки</p> <p>4. Дрожжеподобные грибы</p> <p>5. Верно все</p>	5
161.	<p>Назовите важнейшие компоненты препаратов на основе живых культур симбиотических микроорганизмов:</p> <p>1. Энтерококки, лактобациллы, бифидобактерии</p> <p>2. Энтерококки, лактобациллы, энтеробактерии</p> <p>3. Энтеробактерии, бифидобактерии, энтерококки</p> <p>4. Бифидобактерии, энтеробактерии, лактобациллы</p> <p>5. Верно все</p>	1
162.	<p>Выберите последнюю стадию процесса получения нормофлоров на производстве:</p> <p>1. Смешивание концентрата бактерий с наполнителями</p> <p>2. Фасовка</p> <p>3. Культивирование бактерий</p> <p>4. Подготовка питательной среды</p>	2

	5. Отделение биомассы	
163.	<p>Выберите третью стадию процесса получения нормофлоров на производстве:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Отделение биомассы 2. Смешивание концентрата бактерий с наполнителями 3. Культивирование бактерий 4. Подготовка питательной среды 5. Фасовка 	1
164.	<p>Пробиотики – это группа лекарственных препаратов, действующим началом, которых являются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Микроорганизмы - симбионты ЖКТ 2. Высокоочищенные витамины 3. Гормональные компоненты 4. Дрожжевые микроорганизмы 5. Физиологически активные пептиды 	1
165.	<p>Оптимальная среда для выращивания пропионовых бактерий в промышленном получении витамина В₁₂ содержит все компоненты кроме:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Кукурузного экстракта 2. Глюкозы 3. Дистиллированной воды 4. Солей кобальта 5. Сульфата аммония 	3
166.	<p>При выращивании пропионовых бактерий для промышленного получения витамина В₁₂ оптимальным режимом ферментационного процесса в большинстве случаев является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Периодический 2. Полупериодический 3. Циклический 4. Многоциклический 5. Верно все 	1

167.	<p>Процесс элюирования с колонок витамина В₁₂ на производстве осуществляется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Дистиллированной водой 2. Водным раствором ацетона 3. Этанолом 4. Эфиром 5. Верно все 	2
168.	<p>В производстве какого витамина, в большинстве стадий получения которого используется органический синтез, успешно применяется биоконверсия:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Аскорбиновой кислоты 2. Пиридоксина 3. Цианокобаламина 4. Эргостерина 5. Фолиевой кислоты 	1
169.	<p>Продуценты витамина В₁₂ культивируются на средах, компонентом которой не является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Глюкоза 2. Кукурузный экстракт 3. Соевая мука 4. Рыбная мука 5. Крахмал 	5
170.	<p>В процессе ферментации при получении витамина В₁₂ в ферментер необходимо подавать:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 5,6-диметилбензимидазол со щелочным раствором 2. Дистиллированную воду 3. Раствор глюкозы 4. Раствор сульфата аммония 5. Раствор кислоты 	1
171.	<p>Дополнительная очистка витамина В₁₂ обычно на производстве проводится на колонках с помощью:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Геля 	2

	<ul style="list-style-type: none"> 2. Окиси алюминия 3. Полиэтиленгликоля 4. Окиси кальция 5. Активированного угля 	
172.	<p>Для рибофлавина характерна биологическая активность:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. В обеих формах ФМН и ФАД 2. Только в коэнзимной форме ФМН 3. Только в коэнзимной форме ФАД 4. Коэнзимная форма не имеет значения 5. Верно все 	1
173.	<p>Витамин РР (никотиновая кислота) в промышленных масштабах биотехнологически может быть получена из:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Пекарских дрожжей 2. Бактерий 3. Плесневых грибов 4. Мицелиальных грибов 5. Верно все 	1
174.	<p>К особенностям культуральной среды при получении эргостерина можно отнести:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Малое содержание только углеводов 2. Избыток только азота 3. Избыток азота и углеводов 4. Избыток углеводов, низкое содержание азота 5. Недостаток азота и углеводов 	4
175.	<p>Эргостерин рентабельно получать биотехнологическим методом с помощью таких биологических ресурсов как:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Микроорганизмы 2. Растительные клетки 3. Животные клетки 4. Ферменты 5. Верно все 	1

176.	Из измельченного мицелия β -каротин экстрагируется: 1. Ацетоном 2. Спиртом 3. Подсолнечным маслом 4. Эфиром 5. Верно все	3
177.	Из группы гомологичных убихинонов наибольший интерес представляет: 1. Убихинон-10(Ко Q ₁₀) 2. Убихинон (Ко Q ₆) 3. Убихинон-9 (Ко Q ₇) 4. Убихинон -8 (Ко Q ₈) 5. Верно все	1
178.	При биотехнологическом получении витамина В ₁₂ требуется экстрагирование в течение часа с помощью: 1. Слабо подкисленной воды 2. Дистиллированной воды 3. Сильно подкисленной воды 4. Щелочной воды 5. Водного раствора аммиака	1
179.	При промышленном получении витамина С (аскорбиновая кислота) используется: 1. Органический синтез 2. Микробиологический синтез 3. Химико-энзиматический синтез 4. Биотрансформация 5. Верно все	3
180.	К водорастворимым витаминам относятся: 1. Эргокальциферол (D ₂) 2. Холекальций ферол (D ₃) 3. β -каротин	4

	<p>4. Аскорбиновая кислота</p> <p>5. Убихиноны</p>	
181.	<p>К жирорастворимым витаминам относятся:</p> <p>1. Холекальциферол (D₃)</p> <p>2. Цианокобаламин (B₁₂)</p> <p>3. Аскорбиновая кислота</p> <p>4. Никотиновая кислота (PP)</p> <p>5. Пантотеновая кислота (B₃)</p>	1
182.	<p>Дефицит витамина B₁ при культивировании тиамингетеротрофных микроорганизмов на питательной среде содержащей n-парафины приведет к накоплению в среде:</p> <p>1. А-кетоглутаровой кислоты</p> <p>2. Лимонной кислоты</p> <p>3. Пировиноградной кислоты</p> <p>4. Щавелевоуксусной кислоты</p> <p>5. Глиоксиловой кислоты</p>	1
183.	<p>Рибофлавины способны синтезировать:</p> <p>1. Высшие растения</p> <p>2. Мицелиальные грибы</p> <p>3. Дрожжи</p> <p>4. Бактерии</p> <p>5. Верно все</p>	5
184.	<p>Витамин (D₂) эргокальциферол образуется из эргостерина при определенных условиях, а именно:</p> <p>1. При УФ-облучении</p> <p>2. При термообработке</p> <p>3. При охлаждении</p> <p>4. В темноте</p> <p>5. При обработке ферментами</p>	1

185.	<p>Витамин В₃ (пантотеновая кислота) в промышленных масштабах может быть получена:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Химическим синтезом 2. Биологическим методом 3. Химико-энзиматическим методом 4. Микробиологическим методом 5. Верно все 	1
186.	<p>Оптимальная температура для синтеза антибиотиков</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Выше 30°C 2. 24-29°C 3. 15-18°C 4. 18-22°C 	2
187.	<p>Назовите свойство бета-лактамов, из-за которого их следует, согласно GMP, нарабатывать в отдельных помещениях:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Аллергенность 2. Общая токсичность 3. Хроническая токсичность 4. Эмбриотоксичность 5. Пирогенность 	1
188.	<p>Производство каких групп антибиотиков предусматривают правила GMP в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Пенициллинов 2. Аминогликозидов 3. Тетрациклинов 4. Макролидов 5. Полиенов 	1
189.	<p>На каких средах эффективен биосинтез препаратов антибиотиков:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Богатых источниками азота 2. Бедных питательными веществами 3. Богатых источниками углерода 	2

	<p>4. Богатых источниками фосфора</p> <p>5. Обогащенных витаминами и аминокислотами</p>	
190.	<p>Путем поликетидного синтеза происходит сборка молекулы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Тетрациклина 2. Пенициллина 3. Стрептомицина 4. Циклоспорина 5. Гентамицина 	1
191.	<p>Назовите комплексный компонент питательной среды, резко повышающий производительность ферментации при получении пенициллина:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Кукурузный экстракт 2. Соевая мука 3. Гороховая мука 4. Хлопковая мука 5. Рисовая мука 	1
192.	<p>Назовите предшественник пенициллина, резко повышающий его выход при добавлении в среду:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Фенилуксусная кислота 2. Бета-диметилцистеин 3. Валин 4. Альфа-аминоадипиновая кислота 5. Треонин 	1
193.	<p>Фенилуксусную кислоту как предшественник при биосинтезе пенициллина добавляют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Перед ферментацией 2. В начале ферментации 3. На вторые-третьи сутки после начала ферментации 4. Каждые сутки, в течение 5-суточного процесса 5. В процессе выращивания посевной среды 	3

194.	<p>Скрининг ферментов для получения полусинтетических бета-лактамов необходим вследствие:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Нестабильности ферментов 2. Патентования ранее полученных ферментов 3. Высокой стоимости коммерческих препаратов 4. Различной субстратной специфичности 5. Наличия кофермента 	4
195.	<p>Метициллинорезистентность (MRSA) обусловлена:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Появлением ПСБ-2а с низким сродством к пенициллинам и цефалоспорином, используемым при лечении в клинике 2. Появлением капсулы 3. Быстротой размножения 4. Комплексом β-лактамаз 5. Активным выбросом 	1
196.	<p>Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Низкое сродство рибосом 2. Активный выброс 3. Временная ферментативная инактивация 4. Компартаментация 5. Формирование метаболического шунта 	3
197.	<p>Появление множественной резистентности опухолей к противоопухолевым агентам обусловлено:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Активным выбросом 2. Непроницаемостью мембраны 3. Ферментативной инактивацией 4. Уменьшением сродства внутриклеточных мишеней 5. Сужением пориновых каналов 	1
198.	<p>Из вторичных метаболитов микроорганизмов ингибитором сигнальной трансдукции является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Циклоспорин А 	1

	<p>2. Стрептомицин</p> <p>3. Нистатин</p> <p>4. Эритромицин</p> <p>5. Канамицин</p>	
199.	<p>Какими факторами не обусловлена антибиотикотолерантность патогена:</p> <p>1. Разрушением антибиотика</p> <p>2. Активным выбросом антибиотика</p> <p>3. Низким содержанием автолизина</p> <p>4. Отсутствием мишени для антибиотика</p> <p>5. Конформацией мишени</p>	3
200.	<p>Борьба с фаговой инфекцией в цехах ферментации антибиотической промышленности наиболее рациональна путем:</p> <p>1. Получения и использования фагоустойчивых штаммов биообъекта</p> <p>2. Ужесточения контроля за стерилизацией технологического воздуха</p> <p>3. Ужесточения контроля за стерилизацией питательной среды</p> <p>4. Ужесточения контроля за стерилизацией оборудования</p> <p>5. Ужесточения контроля за фильтрационными установками</p>	1
201.	<p>Причина высокой эффективности антибиотических препаратов «Уназин» и «Аугментин» заключается в:</p> <p>1. Невысокой токсичности (по сравнению с ампициллином и амоксициллином)</p> <p>2. Невысокой стоимости</p> <p>3. Действии на резистентные к бета-лактамам штаммы бактерий</p> <p>4. Пролонгации эффекта</p>	3

	5. Уменьшении проницаемости клеточной мембраны микроорганизма.	
202.	<p>Фунгицидность полиенов - нистатина и амфотерицина в обусловлена:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. формированием в мембране водных каналов и потерей клеткой низкомолекулярных метаболитов и неорганических ионов 2. Взаимодействием с ДНК 3. активацией литических ферментов 4. Подавлением систем электронного транспорта 5. усилением систем электронного транспорта 	1
203.	<p>Причина распространения беталактамаз среди патогенов в клинике - это частота применения:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Беталактамных антибиотиков 2. Аминогликозидов 3. Тетрациклиновых антибиотиков 4. Макролидов 5. Фторхинолонов 	1
204.	<p>При лечении больных СПИДом или при других заболеваниях с пониженной активностью иммунной системы предпочтительнее использовать:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ПСБ-2 2. ПСБ-1а 3. ПСБ -1б 4. ПСБ -3 5. Повышенные дозы антибиотика 	1
205.	<p>Назовите антибиотик, проникающий в клетку патогена за счет энергии аэробного метаболизма:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Бензилпенициллин 2. Стрептомицин 3. Циклоспорин А 4. Фузидин 	2

	5. Нистатин	
206.	<p>Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды 2. Активностью против анаэробных патогенов 3. Отсутствием нефротоксичности 4. Активностью против патогенных грибов 5. Устойчивостью к фагам 	1
207.	<p>Свойство новых беталактамных антибиотиков наиболее ценное при лечении бактериальных осложнений у больных с ВИЧ-инфекцией:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Устойчивость к беталактамазам 2. Слабая токсичность 3. Связывание с ПСБ-2 4. Связывание с ПСБ-3 5. Пролонгированная циркуляция 	3
208.	<p>Механизм действия антибиотиков циклосерина, гликопептидов, ванкомицина, тейкоплакина - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Нарушение синтеза биомакромолекул в клетке 2. Изменение функции цитоплазматической мембраны 3. Воздействие на синтез белка в рибосомах 4. Ингибирование синтеза РНК и метаболизма фолиевой кислоты 5. Ингибирование синтеза мРНК 	1
209.	<p>Механизм действия антибиотиков рифампицинов - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ингибирование синтеза РНК и метаболизма фолиевой кислоты 2. Нарушение синтеза биомакромолекул в клетке 3. Изменение функции цитоплазматической мембраны 4. Воздействие на синтез белка в рибосомах 5. Ингибирование синтеза мРНК 	1

210.	<p>Механизм действия полиеновых антибиотиков - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Нарушение синтеза биомакромолекул в клетке 2. Воздействие на синтез белка в рибосомах 3. Изменение функции цитоплазматической мембраны 4. Ингибирование синтеза РНК и метаболизма фолиевой кислоты 5. ингибирование синтеза мРНК 	3
211.	<p>Механизм действия группы антибиотиков левомецетина, тетрациклина, фузидина - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Воздействие на синтез белка в рибосомах 2. Нарушение синтеза биомакромолекул в клетке 3. Изменение функции цитоплазматической мембраны 4. Ингибирование синтеза РНК и метаболизма фолиевой кислоты 5. Ингибирование синтеза мРНК 	1
212.	<p>Механизм действия антибиотиков актиномицинов - это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Нарушение синтеза биомакромолекул в клетке 2. Изменение функции цитоплазматической мембраны 3. Воздействие на синтез белка в рибосомах 4. Ингибирование синтеза РНК и метаболизма фолиевой кислоты 5. Ингибирование синтеза мРНК 	5
213.	<p>Успехи генной инженерии в области создания рекомбинантных белков больше, чем в создании рекомбинантных антибиотиков, что объясняется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Проблемами безопасности производственного процесса 2. Более простой структурой белков 3. Проблемами подбора клеток хозяев для биосинтеза антибиотиков 4. Большим количеством структурных генов, включенных в биосинтез антибиотиков 5. Резистентностью микроорганизмов к антибиотикам 	4

214.	<p>«Ген-маркер» в генной инженерии необходим для:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Включения вектора в клетки хозяина 2. Отбора колоний, образуемых клетками, в которые проник вектор 3. Включения рабочего гена в вектор 4. Экспрессии белка, как целевого продукта 5. Повышения стабильности вектора 	2
215.	<p>Фермент лигаза используется в генной инженерии для процесса:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Скрепления вектора с оболочкой клетки хозяина 2. Катализа включения вектора в хромосому клеток хозяина 3. Катализа ковалентного связывания углеводно-фосфорной цепи ДНК гена с ДНК вектора 4. Катализа замыкания пептидных мостиков в пептидогликане клеточной стенки микроорганизма. 5. Верно все 	3
216.	<p>Поиск новых рестриктаз для использования в генной инженерии объясняется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Различиями в каталитической активности 2. Различным местом воздействия на субстрат 3. Видоспецифичностью 4. Высокой стоимостью 5. Нестабильностью 	2
217.	<p>Понятие «липкие концы» применительно к генной инженерии отражает:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Гидрофобное взаимодействие липидов 2. Образование дисульфидных связей 3. Взаимодействие нуклеиновых кислот и гистонов 4. Комплементарность нуклеотидных последовательностей 5. Стабильность нуклеотидов 	4
218.	<p>Субстратами рестриктаз, используемых генным инженером, являются:</p>	1

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Нуклеиновые кислоты 2. Гомополисахариды 3. Гетерополисахариды 4. Белки 5. Полисахариды 	
219.	<p>Вектор на основе плазмиды предпочтительнее вектора на основе фаговой ДНК благодаря:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Большему размеру 2. Меньшей токсичности 3. Большой частоты включения 4. Отсутствию лизиса в клетке хозяина 5. Большой устойчивости 	4
220.	<p>Меры безопасности в работе с рекомбинантными белками могут осуществляться на генетическом уровне, что включает:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Микробиологическое фильтрование 2. Стерилизацию оборудования 3. Соблюдение правил GMP 4. Модификацию генома 5. Использование пониженного давления в биореакторе 	4
221.	<p>На растворимость белков существенное влияние оказывают:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. pH, ионная сила, диэлектрические свойства растворителя 2. Температура, давление pH 3. Только ионная сила 4. Только диэлектрические свойства растворителя 5. Верно все 	1
222.	<p>Метод защиты рекомбинантной ДНК от разрушения нуклеазами:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Упаковка в липосомы 2. Трансформация 3. Электропорация 4. Метод биологической баллистики 	1

	5. Верно все	
223.	<p>Выбор микроорганизма как продуцента рекомбинантного белка зависит от:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Степени исследования генома 2. Степени исследования метаболизма на уровне вида 3. Степени патогенности 4. Способности использовать дешевые и доступные питательные среды. 5. Верно все 	5
224.	<p>В качестве продуцентов рекомбинантных белков чаще всего используют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2. <i>Escherichia coli</i> 3. <i>Bacillus subtilis</i> 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5. <i>Bacillus polymyxa</i> 	2
225.	<p>Для разделения белков по заряду используют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Электрофорез в отсутствие додецилсульфата натрия, изоэлектрофокусирование, ионообменную хроматографию 2. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия, изоэлектрофокусирование, ионообменную хроматографию 3. Только изоэлектрофокусирование 4. Только ионообменную хроматографию 5. Верно все 	1
226.	<p>Углубления в матрице (агарозе) для помещения образца с рекомбинантной ДНК делается с помощью:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Гребенки 2. Источника тока 3. Электрофоретической камеры 4. Пластины 5. Ультрафиолетовой лампы 	1

227.	<p>Начальная стадия в технологии получения рекомбинантных белков из предложенных ниже – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Лианеризация векторной ДНК 2. Выбор клетки–донора для выделения нужного гена 3. Выбор клонирующего вектора 4. Выбор селективного маркера 5. Ферментативное расщепление нужного белка рестриктазами 	2
228.	<p>Третья стадия в технологии получения рекомбинантных белков из предложенных ниже – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Выбор клонирующего вектора 2. Лианеризация векторной ДНК 3. Выбор селективного маркера 4. Ферментативное расщепление нужного белка рестриктазами 5. Выбор клетки – донора для выделения нужного гена 	1
229.	<p>В технологии получения рекомбинантных белков стадией получения клонированной ДНК является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Перенос рекомбинантного вектора в клетку хозяина 2. Синтез и выделение рекомбинантных белков 3. Отбор трансформированных клеток с рекомбинантной ДНК по гену- маркеру 4. Встраивание гена в вектор ДНК 5. Лигирование векторной ДНК 	1
230.	<p>В технологии получения рекомбинантных белков стадия отбора трансформированных клеток с рекомбинантной ДНК характеризуется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Синтезом и выделением рекомбинантных белков 2. Трансформированием рекомбинантного вектора в клетку хозяина 3. Использованием гена-маркера 4. Встраиванием гена в вектор ДНК 	3

	5. Лигированием векторной ДНК	
231.	<p>Пятая стадия в технологии получения рекомбинантных белков из предложенных ниже – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Лианеризация векторной ДНК 2. Выбор клонирующего вектора 3. Выбор селективного маркера 4. Ферментативное расщепление нужного белка рестриктазами 5. Выбор клетки–донора для выделения нужного гена 	1
232.	<p>Четвертая стадия в технологии получения рекомбинантных белков из предложенных ниже – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Выбор селективного маркера 2. Лианеризация векторной ДНК 3. Выбор клонирующего вектора 4. Ферментативное расщепление нужного белка рестриктазами 5. выбор клетки – донора для выделения нужного гена 	1
233.	<p>В технологии получения рекомбинантных белков к последней стадии относят:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Синтез и выделение рекомбинантных белков трансформированными клетками с последующим посевом их на питательную среду 2. Отбор трансформированных клеток с рекомбинантной ДНК по гену- маркеру 3. Трансформирование рекомбинантного вектора в клетку хозяина 4. Встраивание гена в вектор ДНК 5. Лигирование векторной ДНК 	1
234.	<p>При экстракции полярных соединений используют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Неполярные растворители 2. Полярные растворители 3. Смесь полярных и неполярных растворителей 	2

	<p>4. Полярность не имеет значения</p> <p>5. Верно все</p>	
235.	<p>Высаливание – это процесс агрегации и осаждения белков, который обусловлен:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Значительным увеличением ионной силы раствора 2. Изменением диэлектрических свойств растворителя 3. Отсутствием изменения диэлектрических свойств растворителя 4. Значительным уменьшением ионной силы раствора 5. Верно все 	1
236.	<p>Для отделения избытка солей от препарата белка используют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Гель-фильтрацию 2. Ионообменную хроматографию 3. Аффинную хроматографию 4. Газовую хроматографию 5. Жидкостную хроматографию 	1
237.	<p>Для идентификации природных и рекомбинантных белков используют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Масс-спектрометрию и центрифугирование 2. Электрофорез и центрифугирование 3. Масс-спектрометрию, электрофорез, N-концевое секвенирование 4. Электронная микроскопия и центрифугирование 5. Верно все 	3
238.	<p>Для осаждения белков в нативной конформации применяют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Сульфат аммония 2. Ацетон 3. Хлорид натрия 4. Хлорид аммония 5. Сульфат натрия 	1

239.	<p>Диализ - это освобождение белковых растворов от растворенных в них электролитов и низкомолекулярных соединений при помощи:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ионообменных мембран 2. Полупроницаемых мембран 3. Дифференциально-проницаемых мембран 4. Совместно ионообменных и дифференциально-проницаемых мембран 5. Верно все 	2
240.	<p>Скоростная седиментация позволяет разделить молекулы белка:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. По форме и молекулярной массе 2. Только по форме 3. Только по плавучей плотности 4. Только по молекулярной массе 5. По форме и плавучей плотности 	1
241.	<p>Преимуществом генно-инженерного инсулина являются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая активность 2. Меньшая аллергенность 3. Меньшая токсичность 4. Большая стабильность 5. Упрощение методики получения 	2
242.	<p>Преимущества получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Несложное оборудование 2. Экономичность 3. Отсутствие дефицитного сырья 4. Снятие этических проблем 5. Сокращение времени производства 	4
243.	<p>Разработанная технология получения рекомбинантного эритропоэтина основана на экспрессии гена в:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Клетках бактерий 	4

	<ul style="list-style-type: none"> 2. Клетках дрожжей 3. Клетках растений 4. Культуре животных клеток 5. Верно все 	
244.	<p>Особенностью пептидных факторов роста тканей является:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Образование вне желёз внутренней секреции 2. Тканевая специфичность 3. Видовая специфичность 4. Трансформационная активность 5. Каталитическая активность 	1
245.	<p>Направление геномики, непосредственно связанное с протеомикой:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Функциональная 2. Структурная 3. Сравнительная 4. Формальная 5. Все направления 	1
246.	<p>Антисмысловые олигонуклеотиды перспективны для лечения:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Инфекционных бактериальных болезней 2. Наследственных моногенных заболеваний 3. Онкологических заболеваний 4. Противогрибковых заболеваний 5. Вирусных заболеваний 	2
247.	<p>Основное требование к геным мишеням в ДНК-диагностике:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Ген-мишень должен быть специфичен для генома конкретного патогенного микроорганизма 2. Ген-мишень должен иметь небольшой размер 3. Ген-мишень должен быть связан со специфическими белками 	1

	<p>4. Ген-мишень должен отвечать за жизненно-важные функции</p> <p>5. Ген-мишень должен иметь специфические сайты рестрикции</p>	
248.	<p>Антисмысловым называют олигонуклеотид, который:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Гибридуется с геном и блокирует его транскрипцию 2. Гибридуется с ДНК и блокирует ее репликацию 3. Гибридуется с мРНК и блокирует трансляцию 4. Кодировывает синтез белка, который не участвует в процессах метаболизма 5. Кодировывает синтез белка с неправильной структурой 	3
249.	<p>В качестве основного метода протеомики используют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Двухмерный электрофорез 2. Микроскопию 3. Газожидкостную хроматографию 4. Радиоизотопный метод 5. Спектральный анализ 	1
250.	<p>Выберите определение понятия иммобилизации фермента:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Связывание субстрата с ферментом при сохранении его каталитической активности 2. Проявление каталитических свойств фермента и его устойчивости 3. Проявление устойчивости фермента при сохранении его каталитической активности 4. Связывание фермента с нерастворимым носителем при сохранении частичной или полной каталитической активности фермента 5. Связывание фермента с коферментом 	4
251.	<p>Преимущества иммобилизации клеток микроорганизма-трансформатора – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Более высокая активность ферментов 2. Стабильность процесса, автоматизация 	5

	<p>3. Уменьшение затрат на очистку целевого продукта</p> <p>4. Длительное функционирование полиферментных систем и регенерация кофакторов</p> <p>5. Верно все</p>	
252.	<p>Что способствует увеличению количества связанного с носителем фермента при физической иммобилизации:</p> <p>1. Количество функциональных групп на белке</p> <p>2. Отсутствие ингибирующего действия на фермент</p> <p>3. Наличие противоположных знаков заряда на носителе</p> <p>4. Уменьшение размера частиц носителя</p> <p>5. Увеличение размера частиц носителя</p>	4
253.	<p>Что относится к недостаткам адсорбционной иммобилизации:</p> <p>1. Стоимость сорбента</p> <p>2. Конфигурация сорбента</p> <p>3. Удельная поверхность сорбента</p> <p>4. Пористость сорбента</p> <p>5. Прочность связывания фермента с носителем</p>	5
254.	<p>Что оказывает влияние на каталитическую активность ферментов, иммобилизованных путем включения в гель:</p> <p>1. Содержание (количество) фермента в геле</p> <p>2. Растворимость фермента</p> <p>3. Диаметр пор геля (структура)</p> <p>4. Молекулярная масса фермента</p> <p>5. Верно все</p>	5
255.	<p>Проблемой иммобилизации с использованием полунепроницаемых мембран является:</p> <p>1. Диффузионный барьер</p> <p>2. Универсальность методик</p> <p>3. Высокое содержание фермента в носителе</p> <p>4. Каталитическая активность фермента</p> <p>5. Стабильность фермента</p>	1

256.	<p>Что относится к проблемам (недостаткам) иммобилизации ферментов путем включения в гель:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Геометрия носителя 2. Стойкость носителя (химическая, механическая и биологическая) 3. Стабилизация ферментов 4. Защита от бактериальной инфекции 5. Диффузия субстрата к ферменту 	5
257.	<p>Проблемой иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Скорость процесса 2. Поверхность раздела фаз 3. Инактивация фермента 4. Диффузионные ограничения 5. Примеси и потеря дорогостоящего катализатора 	5
258.	<p>Какие методы иммобилизации относятся к химическим методам:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Адсорбция фермента 2. Микрокапсулирование 3. Захват фермента в сетку геля 4. Ковалентная сшивка молекул 5. Ковалентное присоединение молекул фермента к носителю 	5
259.	<p>Простейший биореактор колоночного типа пригоден для использования в биокатализе:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Индивидуального фермента 2. Фермента с коферментом 3. Фермента в пермеабилзированной клетке 4. Фермента в интактной клетке 5. Комплекса ферментов в клетке 	1
260.	<p>Активирование нерастворимого носителя в случае иммобилизации биообъекта необходимо для:</p>	3

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Усиления включения фермента в гель 2. Повышения сорбции фермента 3. Повышения активности фермента 4. Образования ковалентной связи 5. Образование фосфорно-диэфирной связи 	
261.	<p>Целью иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Многократное использование 2. Повышение удельной активности 3. Повышение стабильности 4. Расширение субстратного спектра 5. Повышение селективности 	1
262.	<p>Активирование нерастворимого носителя в случае иммобилизации фермента необходимо для:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Образования ковалентной связи 2. Усиления включения фермента в гель 3. Повышения сорбции фермента 4. Повышения активности фермента 5. Повышения селективности фермента 	1
263.	<p>Колоночный биореактор для иммобилизации целых клеток отличается от реактора для иммобилизации ферментов:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Отводом газов 2. Большим диаметром колонки 3. Более быстрым движением растворителя 4. Формой частиц нерастворимого носителя 5. Размерами частиц нерастворимого носителя 	1
264.	<p>Иммобилизация целых клеток-продуцентов лекарственных веществ нерациональна в случае:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Высокой лабильности целевого продукта (лекарственного вещества) 2. Внутриклеточной локализации целевого продукта 	2

	<p>3. Использования целевого продукта только в инъекционной форме</p> <p>4. Высокой гидрофильности целевого продукта</p> <p>5. Высокой гидрофобности целевого продукта</p>	
265.	<p>Иммобилизация индивидуальных ферментов ограничивается:</p> <p>1. Наличием у фермента кофермента</p> <p>2. Высокой лабильностью фермента</p> <p>3. Наличием у фермента субъединиц</p> <p>4. Принадлежностью фермента к гидролазам</p> <p>5. Принадлежностью фермента к лигазам</p>	1
266.	<p>Технология, основанная на иммобилизации биообъекта, уменьшает наличие в лекарственном препарате следующих примесей:</p> <p>1. Белков</p> <p>2. Следовых количеств тяжелых металлов</p> <p>3. Механических частиц</p> <p>4. Органических растворителей</p> <p>5. Пирогенных веществ</p>	1
267.	<p>К антигенам относят:</p> <p>1. Вирусы</p> <p>2. Бактерии</p> <p>3. Нуклеиновые кислоты</p> <p>4. Антибиотики</p> <p>5. Все вышеперечисленное</p>	5
268.	<p>К активной иммуномодуляции относят:</p> <p>1. Вакцины</p> <p>2. Поликлональные антитела</p> <p>3. Моноклональные антитела</p> <p>4. Рекомбинантные интерлейкины</p> <p>5. Все вышеперечисленное</p>	1

269.	<p>Пассивную специфическую иммуномодуляцию вызывают:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Вакцины 2. Поликлональные антитела 3. Рекомбинантные интерлейкины 4. Рекомбинантные интерфероны 5. Все вышеперечисленное 	2
270.	<p>К пассивной неспецифической иммуномодуляции относят:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Рекомбинантные интерфероны 2. Вакцины 3. Поликлональные антитела 4. Моноклональные антитела 5. Все вышеперечисленное 	1
271.	<p>К пассивной иммуносупрессии относят:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Специфическую плазмоиммуносорбцию 2. Трансплантацию костного мозга 3. Неспецифическую гемосорбцию 4. Иммуноплазмофорез 5. Все вышеперечисленное 	1
272.	<p>К неспецифической иммуносупрессии относят:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Вакцины 2. Антицитокиновые моноклональные антитела 3. Рекомбинантные антигены 4. Антиидиотипические антитела 5. Все вышеперечисленное 	2
273.	<p>Низкомолекулярные соединения, которые напрямую не индуцируют образование антител, называются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Гаптены 2. Нуклеиновые кислоты 3. Эпитопы 4. Антигенные детерминанты 5. Все вышеперечисленное 	1

274.	<p>В основе получения Т-клеточных лимфоцитов, в особенности интерлейкинов 1 и 2, а также медиаторов семейства интерферонов лежит:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Генная инженерия 2. Тонкий органический синтез 3. Мутагенез и селекция 4. Клеточная инженерия 5. Верно все 	1
275.	<p>К специфической пассивной иммуносупрессии относят:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Рекомбинантные антигены 2. Толерогены 3. Антиидиотипические антитела 4. Антицитокиновые моноклональные антитела 5. Все вышеперечисленное 	3
276.	<p>К специфической активной иммуносупрессии относят:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Рекомбинантные антигены 2. Иммунотоксины 3. Антиидиотипические антитела 4. Антицитокиновые моноклональные антитела 5. Все вышеперечисленное 	1
277.	<p>К специфическим защитным белкам относятся:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Антитела 2. Система комплемента 3. Цитокины 4. Антигены 5. Верно все 	5
278.	<p>Адьювант вакцины – это:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Вещества, повышающие иммуногенность 2. Специфические антигены, продукты жизнедеятельности микроорганизмов 3. Вещества, определяющие стабильность вакцины при ее хранении 	1

	<p>4. Антиген, предохраняющий вакцину от разрушения и продлевающий срок ее годности</p> <p>5. Вещества, повышающие вирулентность</p>	
279.	<p>Основным недостатком живых (аттенуированных) вакцин является:</p> <p>1. Опасность спонтанного восстановления вирулентности</p> <p>2. Необходимость использования холодильников для хранения</p> <p>3. Сложность культивирования многих патогенных микроорганизмов</p> <p>4. Низкая эффективность таких вакцин</p> <p>5. Опасность заражения персонала на предприятии</p>	1
280.	<p>Консерванты вакцины – это:</p> <p>1. Специфические антигены, продукты жизнедеятельности микроорганизмов</p> <p>2. Вещества, определяющие стабильность вакцины при ее хранении</p> <p>3. Вещества, понижающие вирулентность</p> <p>4. Вещества, повышающие иммуногенность антигена</p> <p>5. Вещества, повышающие вирулентность</p>	2
281.	<p>Действующий компонент вакцины – это:</p> <p>1. Специфические антигены, продукты жизнедеятельности микроорганизмов</p> <p>2. Вещества, определяющие стабильность вакцины при ее хранении</p> <p>3. Антиген, предохраняющий вакцину от разрушения и продлевающий срок ее годности</p> <p>4. Вещества, повышающие иммуногенность антигена</p> <p>5. Вещества, повышающие вирулентность</p>	1
282.	<p>Область применения сывороток включает:</p> <p>1. Профилактику инфекционных заболеваний</p> <p>2. Терапию отравлений ядами микробов</p>	5

	<ul style="list-style-type: none"> 3. Инактивацию токсинов при укусах змей 4. Диагностические системы 5. Все вышеперечисленное 	
283.	<p>К инактивированным вакцинам относятся:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Молекулярные вакцины 2. Дивергентные вакцины 3. Аттенуированные вакцины 4. Рекомбинантные вакцины 5. Все вышеперечисленное 	1
284.	<p>К живым вакцинам относятся:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Аттенуированные вакцины 2. Молекулярные вакцины 3. Корпускулярные вакцины 4. Синтетические вакцины 5. Все вышеперечисленное 	1
285.	<p>Классическая вакцина против оспы является:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Инактивированной цельновирионной вакциной 2. Инактивированной субъединичной вакциной 3. Живой вакциной 4. Инактивированной расщепленной вакциной 5. Инактивированной расщепленной вакциной с адьювантом 	3
286.	<p>Моноклональные антитела получают в производстве:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. При фракционировании антител организмов 2. Фракционированием лимфоцитов 3. С помощью гибридом 4. С помощью протопластов 5. С помощью векторной ДНК 	3
287.	<p>Для получения гибридом лимфоциты выделяют из тканей:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Печени 2. Селезенки 	2

	<p>3. Тимуса</p> <p>4. Кишечника</p> <p>5. Поджелудочной железы</p>	
288.	<p>Гибридомы – это:</p> <p>1. Генетически однородное потомство одной клетки</p> <p>2. Клеточные линии, полученные от слияния нормальных лимфоцитов и миеломных клеток</p> <p>3. Клоновая культура, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам</p> <p>4. Клетки, лишённые клеточной оболочки</p>	2
289.	<p>Антигенсвязывающая активность антител определяется:</p> <p>1. F_{ab} фрагментом</p> <p>2. F_c фрагментом</p> <p>3. C₁ фрагментом</p> <p>4. C_{h1} фрагментом</p> <p>5. Все вышеперечисленное</p>	1
290.	<p>Моноклональные антитела применяются в следующей области:</p> <p>1. Иммунохимические методы анализа</p> <p>2. Направленный транспорт лекарственных веществ</p> <p>3. Очистка субстанций лекарственных веществ</p> <p>4. Создание инновационных лекарственных средств</p> <p>5. Все вышеперечисленное</p>	5
291.	<p>В качестве метки в иммунохимическом анализе не используют:</p> <p>1. Химические индикаторы</p> <p>2. Радиоактивные атомы элементов</p> <p>3. Ферменты</p> <p>4. Липосомы</p> <p>5. Верно все</p>	1

292.	<p>Иммунохимический анализ характеризуется:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Высокой специфичностью, чувствительностью и быстротой 2. Только высокой специфичностью 3. Только высокой чувствительностью 4. Только быстротой 5. Невозможностью проведения количественного определения в многокомпонентных системах 	1
293.	<p>Область применения моноклональных антител, относящихся только к диагностике:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Типирование групп крови и тканей 2. Исследование этиологии и патогенеза различных заболеваний 3. Направленный транспорт лекарств 4. Идентификация молекул 5. Верно все 	1
294.	<p>Местный иммунный ответ в большей степени обусловлен антителами класса:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. IgG 2. IgE 3. IgM 4. IgA 5. IgD 	4
295.	<p>Ферментные метки в иммуноанализе отличаются от радиоактивных:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Стабильностью и безопасностью 2. Только точностью 3. Только чувствительностью 4. Только стабильностью 5. Только безопасностью 	1
296.	<p>Использование флуоресцентных меток по сравнению с иммуноферментными отличается:</p>	1

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокой стоимостью анализаторов и реагентов 2. Чувствительностью 3. Точностью 4. Экспрессностью методики 5. Низкой стоимостью анализаторов и реагентов 	
297.	<p>Что обуславливает преимущество RIA перед определением инсулина по падению концентрации глюкозы в крови животных:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Отсутствие влияния на результаты анализа других белков 2. Меньшая стоимость анализа 3. Исключение дефицитных реагентов 4. Легкость освоения 5. Продолжительность времени анализа 	1
298.	<p>Использование твердофазного иммуноферментного анализа при выявлении хорионического гонадотропина требует:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Только моноклональных антител 2. Только полистирольных шариков 3. Только маркера 4. Антигена 5. Моноклональных антител, полистирольных шариков, маркера 	5
299.	<p>Отличием моноклональных антител, в сравнении с поликлональными, является:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Возможная контаминация посторонним генетическим материалом 2. Низкая чувствительность 3. Низкая специфичность 4. Низкая стоимость 5. Все вышеперечисленное 	1
300.	<p>Гомогенные методы в иммунохимическом анализе в сравнении с гетерогенными:</p>	1

	<ol style="list-style-type: none">1. Более просты методически и менее чувствительны2. Более просты методически3. Более чувствительны4. Более сложны методически5. Более сложны в исполнении и более чувствительны	
--	---	--

5. Вопросы для прохождения промежуточной аттестации

№	Оценочное средство	Эталон ответа
Вопрос 1	Выращивание микроорганизмов в закрытой системе, без добавления питательных веществ – какой это режим культивирования?	Непрерывный
Вопрос 2	Какую фазу не включает кривая роста микроорганизмов?	Стабильную фазу роста
Вопрос 3	Какой фермент, расщепляющий крахмал до глюкозы, используется при лечении поджелудочной железы?	Амилаза
Вопрос 4	Ферментом, определяющим устойчивость патогенных бактерий к пенициллинам, является:	β -лактамаза
Вопрос 5	Для лечения гнойных ран, ожогов, трофических язв используется фермент:	Стрептокиназа
Вопрос 6	Как называются вакцины, содержащие целые клетки убитых бактерий?	Корпускулярные
Вопрос 7	К какому классу соединений по своей биохимической природе относятся ферменты?	Белки
Вопрос 8	Какую группу препаратов получают методом гибридной технологии?	Моноклональные антитела
Вопрос 9	К какому типу вакцин относятся аттенуированные вакцины?	Живые
Вопрос 10	Назовите метод лабораторной диагностики, принцип действия которого основан на реакции «антиген-антитело, при этом один из	Иммуноферментный анализ

	компонентов конъюгирован с ферментом.	
Вопрос 11	Ретроингибирование - это фактор подавления конечным продуктом активности чего?	Начального фермента
Вопрос 12	Биосинтез какой аминокислоты имеет двухфазный характер?	Лизина
Вопрос 13	Увеличение выхода целевого продукта при биотрансформации стероидов достигается при увеличении:	Концентрации субстрата
Вопрос 14	Как называется механизм подавления экспрессии генов?	Репрессия
Вопрос 15	Как называются ферменты, закрепленные на носителе?	Иммобилизованные
Вопрос 16	Каким способом преимущественно получают аминокислоты?	Микробиологическим синтезом
Вопрос 17	Какие стереоизомеры аминокислот в основном обладают биологической активностью?	L-формы
Вопрос 18	При каком способе культивирования микроорганизмов протекает в объеме жидкой питательной среды?	При глубинном
Вопрос 19	В случае применения иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве можно повысить рентабельность за счет?	Множественного использования
Вопрос 20	Превращение дигитоксина в дигоксин клетками <i>Digitalis lanata</i> осуществляется путем:	Биотрансформации
Вопрос 21	Ауксины являются специфическими стимуляторами роста клеток:	Растений

Вопрос 22	Каким способом стерилизуют технологический воздух для биотехнологического производства?	Фильтрованием
Вопрос 23	Когда у патогенного микроорганизма экспрессируются гены house keeping?	Постоянно
Вопрос 24	Что получают из гидрокортизона в результате реакции 1,2-дегидрирования?	Преднизолон
Вопрос 25	Что получают в результате реакции 11 β -гидроксилирования из вещества S?	Гидрокортизон
Вопрос 26	К какому направлению биотехнологии относится получение ферментов?	Инженерная энзимология
Вопрос 27	К каким методам иммобилизации относится ковалентное связывание с носителем?	Химическим
Вопрос 28	Как называются недифференцированные клетки, обладающие свойством тотипотентности?	Каллус
Вопрос 29	Как называется способность отдельных клеток в процессе реализации заключенной в них генетической информации и развитию в целый организм?	Тотипотентность
Вопрос 30	Что происходит с биосинтезом антибиотиков, на средах, бедных питательными веществами?	Усиливается
Вопрос 31	Чем стерилизуют питательные среды?	Насыщенным паром

Вопрос 32	Что считают существенным преимуществом генно-инженерного инсулина?	Меньшую аллергенность
Вопрос 33	Что является меткой в классическом иммунохимическом методе определения инсулина?	Пероксидаза хрена
Вопрос 34	Что относится к субстратам рестриктаз, используемых генным инженером?	Нуклеиновые кислоты
Вопрос 35	Что является мишенью для физических и химических мутагенов в клетке биообъектов?	ДНК
Вопрос 36	К какому типу вакцин относится вакцина АКДС?	Комбинированная
Вопрос 37	Процесс превращения карденолида дигитоксина в менее токсичный дигоксин осуществляется культурой клеток:	<i>Digitalis lanata</i>
Вопрос 38	В производстве какого витамина, в большинстве стадий получения которого используется органический синтез, также успешно применяется биотрансформация?	Аскорбиновая кислота
Вопрос 39	В какой фазе в большом количестве синтезируются первичные метаболиты?	Экспоненциальной
Вопрос 40	К какой группе препаратов относятся лекарственные препараты, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета либо диагностики наличия иммунитета или диагностики специфического	Иммунобиологические

	приобретенного изменения иммунологического ответа на аллергизирующие вещества?	
Вопрос 41	При добавлении какого комплексного компонента питательной среды резко повышается производительность ферментации в случае пенициллина?	Кукурузный экстракт
Вопрос 42	Молекулы какого размера элюируются последними при гель-фильтрации?	Низкомолекулярные
Вопрос 43	Какой антибиотик получают на основе <i>Penicillium notatum</i> ?	Пенициллин
Вопрос 44	Какой антибиотик получают на основе <i>Streptomyces griseus</i> ?	Стрептомицин
Вопрос 45	Как называется комплекс микроорганизмов, участвующих в очистке сточных вод?	Активный ил
Вопрос 46	Какая фаза роста клетки лучше всего подходит для протопластирования суспензионных культур?	Логарифмическая
Вопрос 47	Что является основным белком плазмы крови доноров в количественном отношении?	Альбумин
Вопрос 48	Что происходит с биосинтезом антибиотика при избыточном содержании фосфора в питательной среде?	Снижается
Вопрос 49	Как называется явление, при котором происходит значительное накопление биомассы в противовес биосинтезу целевых продуктов в антибиотической промышленности?	Катаболитная репрессия

Вопрос 50	Получение протопластов из бактериальных клеток возможно путем обработки:	Лизоцимом
-----------	--	-----------

6. Ситуационные задачи для прохождения промежуточной аттестации

Задача 1

В процессе промышленного производства аскорбиновой кислоты используют многостадийный химический синтез, в который наряду с тонкими химическими реакциями встроена и технологически необходимая биосинтетическая реакция, что является одним из примеров успешного сочетания органического синтеза с биосинтезом.

При проведении этапа биосинтеза на производстве применяют определенные микроорганизмы, осуществляющие биосинтетические реакции. Не менее важными являются оптимизация условий ферментации и контроль за количеством биомассы микроорганизмов в ферментационном аппарате.

Проанализируйте ситуацию с точки зрения:

- *химической реакции биотрансформации, определяющей проведение биосинтеза и получение ожидаемого результата при осуществлении биотрансформации;*
- *выбора микроорганизмов для биоконверсии и оптимального подбора компонентов питательной среды (источников углерода, азота и фосфора);*
- *возможности увеличения выхода целевого продукта.*

Вариант ответа:

В процессе синтеза аскорбиновой кислоты имеется лишь одна стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу как классический пример микробиологического производства.

Для получения сорбозы культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического действия, оснащенных мешалками и барботерами для усиления аэрации в течение 20-40 ч. Также привести пример получения 2-кетогулоновой кислоты.

Задача 2

Довольно часто при получении ЛС биотехнологическими методами синтез метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до целевого продукта. В этом случае на помощь приходит биотрансформация (биоконверсия), которая особенно эффективна в

бактериальных клетках, но в ряде случаев, такой процесс можно провести и с помощью культур растительных клеток, осуществляющих самые различные реакции биотрансформации: гидроксирование, изомеризация, этерификация и т.д., что в результате приводит к структурно-функциональным изменениям трансформируемого химического соединения.

Успешно применяют биотрансформацию карденолидов, гликозиды которых широко распространены в практике лечения болезней сердца. *Проанализируйте метод биотрансформации с точки зрения:*

- *оптимизации условий и ожидаемого результата получения ЛС;*
- *целесообразности использования метода иммобилизации клеток растения *Digitalis lanata*.*

Вариант ответа:

В качестве примера можно привести биотрансформацию дигитоксина в дигоксин клетками *Digitalis lanata*. Биотрансформация дигитоксина в дигоксин происходит за счет реакции:

Иммобилизация растительных клеток имеет преимущества по сравнению с суспензионными культурами за счет:

Задача 3

При получении генно-инженерного инсулина, основанного на отдельном биосинтезе 2 цепей, в качестве продуцента используют определенные микроорганизмы и модифицированный чужеродный ген (точнее, оперон) с лидерной последовательностью аминокислот (метионином и β -галактозидазой), отделяемой на последней стадии контакта секретлируемого белка и клетки. Ферментацию проводят на среде с лактозой (или галактозой) для последующего объединения свободных инсулиновых цепей. Далее осуществляют выделение и очистку полученного инсулина.

На основе общей схемы получения инсулина и требований к его качеству обоснуйте:

- *условия выбора конкретного продуцента инсулина и вектора, с помощью которого можно ввести в клетку чужеродный ген (ген инсулина);*
- *необходимость использования лидерной последовательности аминокислот с метионином и β -галактозидазой в синтезе инсулина и роль лактозы*

(галактозы) в процессе ферментации и получении завершённых инсулиновых цепей и их объединении;

- возможность проявления токсичности генно-инженерного инсулина; с чем это может быть связано, учитывая видоспецифичность данного инсулина, его серийное качество и уровень культуры производства на предприятии?

Прокомментируйте правила безопасности работы с микроорганизмами на генетическом и физическом уровнях.

Вариант ответа:

Схема получения рекомбинантного инсулина по «Eli Lilly» (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.

- Введение полученных плазмид в клетку *Escherichia coli* с 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.

Задача 4

В настоящее время существует международная программа системы поиска и отбора антимикробных агентов, подавляющих размножение патогена только в инфицированном организме, т.е. система, позволяющая клонировать гены, которые не экспрессируются в искусственных условиях (*in vitro*). Данная система подразумевает использование определенных методов, реактивов (наборы для клонирования, рестриктазы), тест-объектов и решает такие задачи, как:

- выделение и очистка ДНК (электрофорез);
- культивирование патогенов, например *Salmonella typhimurium*;

- создание вектора на основе плазмиды, несущей беспромоторные гены хлорамфеникол-ацетилцетилтрансферазы и лактозного оперона;
- заражение лабораторных животных (мыши);
- высев патогенов из животных объектов.

Расположите последовательно этапы данной системы скрининга антимикробных агентов, учитывая применение:

- генно-инженерных методов при получении набора различных плазмид;
- набора различных штаммов *E. coli* с разными частями генома сальмонеллы;
- индикаторной среды для отбора нужных колоний.

Прокомментируйте результаты и возможности применения данной системы при поиске антимикробных агентов, используемых в качестве ЛС.

Вариант ответа:

У патогенных микроорганизмов обнаружены гены, которые не поддаются идентификации для их дальнейшего использования в качестве мишеней при поиске новых ЛС. Так называемые молчащие *in vitro* гены. Подавление их функций антимикробными агентами приводит к подавлению роста (размножения) патогена именно в условиях *in vivo*. Именно поэтому поиск и идентификация генов вирулентности являются конечной целью исследователей, создающих новые антимикробные лекарственные препараты.

В качестве примера такой работы можно привести метод IVET (*in vivo* expression technology). Суть метода:

- Геном патогенной бактерии (*Salmonella typhimurium*) делят на сотни фрагментов, кратных 1, 2, 3 и т.д.
- Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфеникол-ацетил трансферазы (*cat*). Полученный фрагмент является сдвоенным (*x-cat*, где *x* - фрагмент генома сальмонеллы, а *cat* - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы). К этому сдвоенному фрагменту присоединяют лактозный оперон, также лишенный промотора (*lac Z*). На этом этапе генные инженеры получают фрагмент, состоящий уже из 3 частей: *x-cat-lac Z*.
- Полученный фрагмент (*x-cat-lac Z*) включают в плазмиду.
- Эти плазмиды вводят в клетку *E. coli*.

- Далее следует внедрение клеток *E. coli* в организм лабораторного животного (мышь) с одновременным введением ему (ей) хлорамфеникола.
- Через сутки из ткани животного на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.
- Затем колонии анализируют.

Задача 5

При получении штаммов суперпродуцентов аминокислот (треонина, лизина и др.) используют микроорганизмы *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Bacillus subtilis*. В одном случае биосинтез аминокислоты идет одновременно с ростом биомассы (путь получения аминокислоты одностадийный), в другом случае сначала идет рост биомассы и только потом синтез аминокислоты (путь двухстадийный).

В данной ситуации получения аминокислот обоснуйте:

- *преимущества биосинтеза по сравнению с органическим синтезом и подбор соответствующих микроорганизмов для получения штаммов-продуцентов, способных к сверхсинтезу нужной аминокислоты, если конечным продуктом будет лизин или треонин;*
- *выбор пути биосинтеза для лизина или треонина и особенности питательных сред;*
- *условия ферментации (подготовительная стадия и биосинтез).*

Вариант ответа:

Альтернативой химическому синтезу служит микробиологический процесс, при котором специально подобранные селекционные или сконструированные методами генной инженерии штаммы продуценты способны осуществлять сверхсинтез аминокислот. Микробиологическое промышленное производство L-аминокислот можно осуществлять по двум технологическим схемам.

Двухступенчатый способ предполагает образование и подготовку предшественника, а также биосинтез ферментного препарата микробного происхождения, который будет трансформировать предшественник в целевую аминокислоту.

Одноступенчатый способ синтеза аминокислот с помощью микроорганизмов

основан на культивировании строго определенного штамма-продуцента целевой аминокислоты при соответствующих параметрах ферментационного процесса.

Продуцент лизина - *Corynebacterium glutamicum* (коринебактерии) - имеет единственную β -аспартакиназу (фермент), активность которой регулируется путем согласованного ингибирования по принципу обратной связи.

Для получения L-треонина используют промышленный мутантный штамм *E. coli* (энтеробактерии), где система регуляции биосинтеза аминокислоты основана на принципе дифференциальной регуляции изоферментами.

Задача 6

Одно из существенных мест на фармацевтическом рынке занимают стероидные гормоны, являющиеся не только жизненно важными, но и используемые как ЛС, обладая большой широтой спектра и высокой избирательностью физиологического воздействия. Известно, что с момента установления структуры основных стероидных гормонов в качестве метода получения лекарственных препаратов на основе этих соединений стали применять биотрансформацию.

Проанализируйте:

- *зависимость биологической активности от структуры стероидных гормональных препаратов;*
- *достоинства и недостатки сырья, используемого при получении гормональных стероидных препаратов;*
- *возможности использования биотрансформации при получении наиболее ценных гормональных препаратов.*

Вариант ответа:

К стеринам (стеролам) относят стероиды, несущие в положении C₃ гидроксильную группу. Одним из наиболее изученных стеринов (класс зоостеринов) является холестерин. Другие стерины в природе отличаются от холестерина или по длине боковой цепи, или по степени насыщенности. В процессе образования стероидных гормонов из холестерина сначала образуется прегненолон - основной промежуточный продукт биосинтеза стероидов и кортикостероидов. При получении из прогестерона гормональных препаратов

кортикостерона и гидрокортизона (кортизол), тестостерона и эстрогена их биологическая активность связана с биотрансформацией структуры стероидов.

Исходным сырьем для производства стероидных препаратов являются:

- отечественный соласодин (низкое процентное содержание стероидов);
- импортный диосгенин и продукты его превращения: андростендион, андростендиендион;
- наиболее экономичен β -ситостерин (растения и отходы переработки древесины).

Задача 7

Как известно, производство витамина B_{12} (кобаламин) является чисто биотехнологическим способом его получения, когда в качестве продуцента данного витамина используют пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*, выращиваемые на богатой среде в определенных условиях ферментации с обязательным добавлением предшественника витамина B_{12} - 5, 6-диметилбензимидазола.

В этой ситуации:

- *сделайте оптимальный выбор метода ферментации и условий ее проведения;*
- *докажите необходимость добавления 5,6-диметилбензимидазола в определенное время после начала ферментации и предупредите образование коферментной формы витамина B_{12} ;*
- *предложите методы выделения и очистки данного витамина, учитывая место его накопления.*

Вариант ответа:

Продуцентом витамина B_{12} являются пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*. Добавление в среду предшественника витамина B_{12} - 5, 6-диметилбензимидазола - резко повышает продуктивность продуцента. Через 72 ч после начала ферментации вносят предшественник - 5,6-диметилбензимидазол. Длительность ферментации составляет около 3 суток. Поскольку витамин B_{12} сохраняется в клетках бактерий, биомассу отделяют сепарированием и извлекают из нее целевой продукт с помощью экстракции подкисленной водой (рН от 4,5 до 5,0) при температуре 85-90°C в течение часа. Затем следует кристаллизация витамина из водно-ацетонового раствора,

химическая очистка и изготовление лекарственных форм из полученного продукта.

Задача 8

Иммунобиотехнология как наука и производство, с одной стороны, предлагает средства для усиления иммунной защиты организма в ответ на различные неблагоприятные факторы окружающей среды - вакцины, сыворотки, рекомбинантные интерфероны, интерлейкины и другие цитокины, с другой стороны, путем широкого применения моноклональных антител решает такие актуальные для фармации задачи, как безопасность и контроль качества лекарственных препаратов.

Выберите иммунобиопрепараты для усиления иммунного ответа:

- *пассивного специфического типа воздействия;*
- *пассивного неспецифического типа воздействия;*
- *активного типа воздействия.*

Прокомментируйте возможности использования моноклональных антител при решении проблемы безопасности ЛС (мониторинг ЛС).

Вариант ответа:

Иммуномодуляторы либо усиливают, либо ослабляют иммунный ответ организма. Иммунный ответ - сложный процесс межклеточного взаимодействия различных типов лимфоидных клеток с участием специфических гормонов, вследствие которого В-клетки активно синтезируют специфические антитела против данного антигена.

Антитела, однородные по структуре и специфичности, называют моноклональными антителами.

Способы усиления иммунного ответа по типу воздействия разделяют на активные и пассивные, а также на специфические и неспецифические. Активную иммунизацию вызывают вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей, выступающих в качестве иммунобиопрепаратов.

По способу получения вакцины делят на живые вакцины с ослабленной вирулентностью и неживые вакцины (молекулярные анатоксины - дифтерийный, столбнячный, ботулинический).

Живые вакцины могут быть как вирусного происхождения (например, для профилактики оспы, кори, гриппа, краснухи, полиомиелита), так и бактериального происхождения для профилактики сибирской язвы, чумы, туберкулеза и др. В ответ на введение вакцины в организме человека или животного вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к инаktivации патогена, блокируя его пролиферацию, что не позволяет развиваться заболеванию.

Задача 9

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывает новые возможности создания эффективных ЛС.

Продемонстрируйте возможности и достоинства гидролаз при модификации таких широко применяемых антибиотиков, как пенициллины и цефалоспорины на основании:

- *уникальных свойств гидролитических ферментов и определенных изменений в структуре данных антибиотиков, связанных с получением более эффективных аналогов;*
- *сравнения химического пути трансформации с биокаталитической технологией;*
- *производственных результатов получения этих антибиотиков как целевых продуктов.*

Вариант ответа:

В отличие от химической трансформации биокатализ обладает уникальной специфичностью и избирательностью действия ферментов, возможностью проведения процесса в «мягких» условиях.

Гидролитические ферменты (гидролазы) нашли наибольшее применение в практике по следующим причинам:

- гидролитические реакции в водной среде, как правило, полностью термодинамически сдвинуты в сторону образования продуктов;
- кинетика реакций ферментативного гидролиза легко поддается количественному описанию до глубоких степеней превращения.

Возможности гидролаз можно представить при модификации пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых, более эффективных аналогов

пенициллинов и цефалоспоринов связано с изменением боковой цепи при сохранении ядра антибиотика - 6-АПК или 7-АЦК как ключевых соединений для синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов.

Задача 10

Одна из инфекционных клиник закупила партии пенициллина и стрептомицина. Через некоторое время в аптеку пришли представители клиники с жалобой на отсутствие терапевтического эффекта почти у всех больных клиники. После проверки в лаборатории было установлено, что препараты не фальсифицированы и соответствуют качеству стандартной продукции.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- *возможных механизмов антибиотикорезистентности у микроорганизмов и генетических аспектов явления «инфекционной резистентности» или «госпитальной инфекции»;*
- *возможных механизмов индукции β -лактамаз (PBP_s-2 и PBP_s-3) и их ингибирования;*
- *разрешения данной ситуации.*

Вариант ответа:

Плазмиды - генетические элементы микробной клетки, представляющие собой кольцевые молекулы ДНК размером в сотни раз меньшим, чем размер хромосомы. Опасность плазмидной резистентности в генетическом плане выражается в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку путем конъюгации (аналог полового процесса), т.е. без деления клетки, однако плазида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может очень быстро передать резистентность огромному количеству клеток. Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Отсюда возникло понятие полирезистентности микроорганизмов. Такие полирезистентные штаммы возбудителей инфекции представляют серьезную проблему в инфекционной клинике, вызывая так называемую госпитальную инфекцию, когда к тем

антибиотикам, которые используют в инфекционной клинике на тот момент, возникает устойчивая резистентность возбудителей различных инфекционных заболеваний, и соответственно антибиотик теряет свою активность.

Задача 11

Определите оптимальные параметры ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина на основе анализа табличных данных, охарактеризуйте процесс биосинтеза с точки зрения его результатов и применения данной ферментационной среды, т.е. является ли ее состав оптимальным в данном случае? Если нет, то, что необходимо изменить?

Оборудование: аппарат «Сетмар 1».

Состав среды, %:

- крахмал картофельный — 6,5;
- соевая мука — 1,7;
- глюкоза — 1,5;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,4;
- K_2HPO_4 — 0,01;
- CaCO_3 — 0,5;
- pH перед посевом — 7,1.

Таблица. Показатели ведения процесса в аппарате «Сетмар 1» с использованием крахмальной среды

№ пробы	Часы роста	Биомасса, %	pH	Углеводы общие	Глюкоза	Азот	PO ₂	Активность, мкг/мл
1	0	—	7,1	6,55	1,56	86,8	65	50
2	11	5	6,9	6,22	1,56	86,8	60	175
3	35	10	6,9	5,98	0	84,0	57	277
4	59	38	6,5	5,36	—	81,2	52	306,6
5	83	32	7,0	4,31	—	53,2	43	297,3
6	107	30	8,2	4,31	—	89,6	43	146

Сделайте обобщающий вывод о наличии оптимальных изменений, позволяющих произвести максимальное количество антибиотика.

Вариант ответа:

В данном процессе необходимо учитывать:

- исчерпание компонентов среды с учетом скорости их потребления; в процессе ферментации остались практически неиспользованными азот и углеводы; зависимость биомассы от активности продуцента (удельная активность) минимальная;
- влияние параметров на окончание процесса; истощения среды нет, но есть автолиз, параметры процесса не сбалансированы, наблюдается защелачивание среды и снижение активности биосинтеза антибиотика;
- возможность продления активной фазы процесса для увеличения выхода антибиотика. Для этого необходимо увеличить массообмен клеток и усилить их дыхание, это можно сделать, если увеличить число оборотов мешалки ферментера, усилить барботаж и аэрацию в целом.

Задача 12

Определите оптимальные параметры ведения процесса биосинтеза противоопухолевого антибиотика рубомицина на основе анализа табличных данных и охарактеризуйте этот процесс биосинтеза с точки зрения его результатов и применения данной ферментационной среды, т.е. является ли ее состав оптимальным в данном случае? Если нет, то что необходимо изменить?

Оборудование: аппарат «Chemar 2».

Состав среды, %:

- гороховая мука — 3;
- сахароза — 7;
- NaCl — 0,4;
- KCl — 0,04;
- K_2HPO_4 — 0,08;
- $(NH_4)_2SO_4$ — 0,4;
- $CaCO_3$ — 0,8;
- pH перед посевом — 7,41.

Таблица. Показатели ведения процесса в аппарате «Chemar 2» с использованием сахарозно-гороховой муки

№	Часы	Био-	pH	Углево-	Глюко-	Азот	PO ₂	Актив-
---	------	------	----	---------	--------	------	-----------------	--------

про- бы	роста	масса, %		ды общие	за			НОСТЬ, МКГ/МЛ
1	0	0	7,15	5,57	0,88	114,8	65	50,7
2	11	5	7,07	5,54	–	112	30	160,6
3	35	25	6,7	4,0	–	81,2	22	335,8
4	59	25	6,75	3,41	–	28	20	552,8
5	83	25	6,75	2,32	–	8,4	20	685,8
6	107	25	6,6	0,9	–	1,02	25	823

Сделайте обобщающий вывод о наличии оптимальных изменений, позволяющих произвести максимальное количество антибиотика.

Вариант ответа:

В данном процессе можно выделить следующие особенности:

- компоненты среды почти полностью исчерпаны;
- процесс имеет высокую удельную активность биосинтеза антибиотика;
- оптимальное влияние параметров на окончание процесса;
- в целях увеличения выхода антибиотика и повышения рентабельности процесса можно продлить время ферментации, применяя азотно-углеводную подпитку.

Задача 13

Биотехнология как наука и производство основана на использовании определенных агентов и процессов для воздействия на живую природу с целью получения ценных продуктов, в том числе и ЛС.

В части анализа роли биотехнологии для современной фармации:

- *сравните, что отличает современную биотехнологию в ее историческом развитии; приведите схему биотехнологического производства;*
- *расшифруйте, что понимают под терминами «агенты» и «процессы» в биотехнологии;*
- *представьте на конкретных примерах возможности воздействия на живую природу для получения ЛС.*

Вариант ответа:

Современная биотехнология решает многие проблемы в части фармации по

созданию новых эффективных и безопасных ЛС, профилактических препаратов и различных диагностикумов. Номенклатура лекарственных препаратов, полученных на основе биообъектов, в силу объективных причин имеет тенденцию к своему расширению. В категорию лекарственных препаратов, полученных биотехнологическим путем входят:

- собственно ЛС - аминокислоты и препараты на их основе, антибиотики, ферменты, коферменты, кровезаменители и плазмозаменители, гормоны стероидной и полипептидной природы, алкалоиды;
- профилактические средства - вакцины, анатоксины, интерфероны, сыворотки, иммуномодуляторы, нормофлоры;
- диагностические средства - ферментные и иммунные диагностикумы, препараты на основе моноклональных антител и иммобилизованных клеток.

В современном представлении «биотехнология» - это направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также для промышленного получения полезных для человека продуктов, в том числе ЛС.

Под термином «агенты» понимают биообъекты как продуценты (источник ЛС) и ферменты (биокатализаторы). Процессы означают продуцирование (биосинтез) либо биотрансформацию.

Схема биотехнологического производства включает:

- исходное сырье, энергетические ресурсы, квалифицированный труд;
- биообъект (продуцент, фермент);
- ферментер (биореактор);

Задача 14

Существуют вполне определенные требования и условия для создания и развития биотехнологического производства ЛС. В частности, это касается проблемы выбора биообъектов для масштабирования производства. Имеются существенные различия между диким штаммом и промышленным штаммом. Штамм обладает вполне конкретными свойствами природного характера, а производственный процесс имеет свои требования к этому штамму. Существуют способы воздействия на дикий штамм с целью удовлетворения требований производства ЛС.

Проанализируйте данную ситуацию с точки зрения:

- *представления о биообъекте и его функциях;*
- *соответствия свойств продуцента требованиям производства ЛС и проблеме безопасности при работе с продуцентами;*
- *применения конкретных методов преобразования биообъекта для дальнейшего использования его в создании новых продуцентов ЛС.*

Вариант ответа:

Из определения биотехнологии следует, что основным инструментом получения или модификации ЛС является биообъект. Именно поэтому биообъект это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо фермент, катализирующий присущую ему реакцию. Для использования активно функционирующего биообъекта необходимо знать его свойства с целью его совершенствования.

Выбор биообъекта зависит от его конкретных свойств, таких как безвредность, устойчивость к фагам и вирусам, активность биосинтеза, скорость роста и накопление биомассы, стабильность по производительности, чувствительность к условиям культивирования (аэрация, рН, температура), потребность в источниках углеводов и азота, использование дешевых и доступных питательных сред, соответствие условиям промышленного производства (отсутствие неприятного запаха, невысокая вязкость среды).

Задача 15

Как известно, при использовании клеточной инженерии при создании новых продуцентов широко применяют методику протопластирования (получения протопластов) как процесс конструкции гибридных структур.

В плане решения задачи получения новых продуцентов как источников новых ЛС предложите:

- *схему получения протопластов и гибридных структур;*
- *условия сохранения протопластов;*
- *конечные цели, достигаемые с помощью продуктов гибридной природы.*

Вариант ответа:

Одним из способов модификации биообъекта с целью усиления его функциональной активности является метод клеточной инженерии. Клеточная

инженерия - это техника обмена фрагментами ДНК, участками хромосом у прокариот и участками и целыми хромосомами у эукариот независимо от степени эволюции.

Для получения гибридных клеток применяют технику протопластирования.

Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду. Чтобы отличить гибридную клетку от негибридной, необходимо включить еще один протопласт, несущий маркер.

Задача 16

В современной биотехнологии при создании ЛС особое место отводится генной инженерии, суть технологии которой заключается в искусственном соединении отдельных фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку с целью получения рекомбинантных белков. Для осуществления этого необходимы определенные условия, наличие транспортного устройства для внесения ДНК в клетку продуцента, использование ферментов для включения нового гена. Генная инженерия оперирует такими понятиями, как вектор, рестриктазы, липкие концы, сайт узнавания, лигазы, ген-маркер, компетентность клетки, экзон, интрон.

С представленных общих позиций по генной инженерии сформулируйте конкретные условия:

- расшифруйте понятие «вектор» и пути его введения в клетку, предложите ферменты, работающие в этой ситуации;*
- предложите технику генно-инженерного эксперимента (стадии);*
- сравните процесс образования мРНК у эукариот и прокариот.*

Вариант ответа:

Цели генной инженерии - создание новых продуцентов целевых продуктов (новые ЛС, диагностические и профилактические препараты).

Суть технологии - соединение фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку посредством ферментов эндонуклеаз, в частности рестриктаз.

В процессе образования молекулы мРНК имеет место процесс сплайсинга (сращивания). У эукариот, в отличие от прокариот, ген представляет собой мозаичную структуру, содержащую наряду с экзонами (последовательности

оснований, несущие информацию) интроны (последовательности оснований, не несущие информацию).

Задача 17

Возникновение таких новых дисциплин, как геномика и протеомика, явилась настоящим прорывом в биологии и имеет большое значение при создании новых, более эффективных ЛС. Если геномика обозначает совокупность всех генов организма, то протеомика подразумевает совокупность всех каталитических и структурных белков в клетке эукариота или прокариота. Задача геномики - полная генетическая характеристика именно всей клетки. Геномика позволяет выразить сущность организма, его видовые и индивидуальные отличия, предвидеть реакцию на внешние воздействия. Геномика имеет свою классификацию, открывает новые возможности для генотерапии, создания нетрадиционных ЛС, например, таких как антисмысловые олигонуклеотиды.

В свете представленной информации приведите:

- классификацию геномики с обозначением соответствующих задач;
- возможности генотерапии;
- ситуации возможного применения антисмысловых олигонуклеотидов.

Вариант ответа:

Согласно целям и задачам различают структурную, сравнительную и функциональную геномику. Структурная геномика занимается идентификацией геномов клеток и отдельных структурных генов по определенным характеристикам, которые относятся к хромосоме у прокариот и к каждой из хромосом у эукариот. Сравнительная геномика получает сведения о степени гомологии родственных генов. Функциональная или метаболическая геномика устанавливает связь между геномом и метаболизмом.

Практическим применением достижений геномики является генотерапия. Для реализации возможностей генотерапии требуется предварительное создание рекомбинантной генетической конструкции с нормальной копией дефектного гена, а также создание для этой конструкции вектора, переносящего ее в клетки организма пациента. Генотерапия *ex vivo* предполагает введение путем трансфузии или трансплантации исправленных копий дефектного гена,

предварительно извлеченных из клеток организма пациента. При генотерапии *in vivo* осуществляется доставка в ткани пациента нормального, гена (чужеродного).

Антисмысловые олигонуклеотиды - ЛС XXI века, представляющие собой комплементарную для определенного участка гена последовательность нуклеотидов (длиной 15-20 нуклеотидов).

Задача 18

Современный скрининг ЛС предполагает получение новых ЛС, более эффективных и безопасных. Скрининг как метод предполагает поиск и отбор продуцентов, с помощью которых можно получать новые ЛС с достаточной степенью функциональной активности, определяемой по биологическим тестам с дальнейшей расшифровкой химической структуры и механизма действия. Скрининг можно проводить в классическом варианте или на генном уровне.

Проанализируйте последние достижения геномики и протеомики, помогающие в решении проблем поиска новых эффективных и безопасных ЛС. В ответе используйте:

- *современные данные о последних достижениях геномики и протеомики;*
- *понятие таргетного скрининга;*
- *международные программы поиска *ivi*-генов.*

Вариант ответа:

Успехи молекулярной биологии в развитии таких направлений, как геномика и протеомика, позволяют исследователю при использовании соответствующих международных баз данных получать сведения о каждом гене, входящем в геном тест-объекта, получить любой ген в изолированном состоянии, копировать его с помощью ПЦР и на полученной таким образом матрице нарабатывать сначала информационную РНК (иРНК), а затем уже в бесклеточной рибосомной системе и специфический для этого гена белок. Используя такой метод скрининга, можно целенаправленно вести поиск ингибиторов функций продукта конкретного гена. Предпочтение тому или иному гену отдают исходя из задачи (какого рода ЛС мы хотели бы получить). В дальнейшем отобранные таким образом БАВ должны быть испытаны на предмет клеточной проницаемости, достижения мишени, токсичности и т.д.

Задача 19

Развитие резистентности сегодня является настолько серьезной проблемой лекарственной терапии, что грозит вернуть человечество к «доантибиотической эре». Особенно опасна в этом смысле плазмидная резистентность. Известно, что плазида как внехромосомный фактор наследственности способна самостоятельно реплицироваться в клетке независимо от процесса ее деления. Плазида - носитель генов информации (всего около 30 генов). Плазмиды могут содержать гены резистентности к различным антибиотикам, которые легко передаются из клетки в клетку при конъюгации. Гены β -лактамаз, особенно цефалоспоринаяз, могут локализоваться также и в бактериальной хромосоме. Резистентность может существовать и за счет генов клетки, делающих мембрану непроницаемой для антибиотиков.

В свете обозначенной проблемы представьте:

- *схему развития плазмидной резистентности и первоисточник генов резистентности;*
- *способы преодоления резистентности;*
- *различие хромосомной и плазмидной локализации структурных генов β -лактамаз;*
- *роль конъюгативных транспозонов в проявлении резистентности и возникновении госпитальной инфекции.*

Вариант ответа:

Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов и обусловило возникновение «генов резистентности» как в хромосоме, так и в плазмиде. Плазмиды с генами резистентности к антибиотикам получили название R-плазмид (старый термин - R-факторы). Мутировавшие хромосомные гены также могут оказаться в плазмидах и быть переданы в другие клетки, но в этом случае переноса резистентности не будет, так как свои хромосомные гены, преобладая над чужими (плазмидными), обеспечивают антибиотикочувствительность и не дают развиваться антибиотикорезистентности. Иногда в одной плазмиде локализуются несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. На основании этого факта возникло понятие полирезистентности микроорганизмов.

Задача 20

Как известно, под названием «антибиотики» объединены вещества, образуемые одними микроорганизмами для подавления роста других микроорганизмов. Однако антибиотики можно рассматривать или классифицировать и по технологии их получения, и по терапевтическому эффекту в отношении конкретных заболеваний. Кроме того, антибиотики в какой-то мере сопоставимы с антисептиками.

Проанализируйте варианты подхода к определению и классификации антибиотиков, подтвердите конкретными примерами; представьте также:

- варианты скрининга антибиотиков;
- методы определения антимикробной активности антибиотиков;
- сравнение с антисептиками (использование, достигаемые цели, механизм действия).

Вариант ответа:

Скрининг (поиск и отбор) продуцентов антибиотиков может быть ненаправленным (первичным), когда отбирают наиболее активные микроорганизмы-продуценты по способности продуцировать антибиотики или другие БАВ. Направленный скрининг - поиск и отбор продуцентов антибиотиков определенного химического строения или с определенным механизмом антагонистического действия.

Образцы почв с большим разведением высевают на твердые питательные среды в чашках Петри, чтобы получить фактически из одной клетки штамм почвенных микроорганизмов (штамм - это культура, выросшая из одной клетки). Далее определяют физиологические параметры штамма, его антибиотическую активность, которую оценивают по зоне отсутствия роста на твердых питательных средах тех или иных бактерий вокруг посеянного штриховым способом изучаемого штамма, или по зоне отсутствия роста вокруг лунки в агаре, или же вокруг впаянного в агар металлического цилиндра (без дна), заполненного культуральной жидкостью исследуемого штамма.

Существует два варианта определения антибиотической активности на основе метода диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов, образующихся при испытании растворов стандартного

образца и испытуемого препарата.

Задача 21

Важнейшая группа антибиотиков, образуемых плесневыми грибами и объединенных под общим названием «β-лактамы» (пенициллины и цефалоспорины), достаточно широко представлена на фармацевтическом рынке.

Проведите анализ β-лактамов с точки зрения:

- *продуцентов, химической структуры и биологической активности;*
- *биологической роли антибиотиков для продуцентов и механизмов защиты продуцентов от антибиотиков;*
- *механизма биосинтеза и механизма действия на бактериальную клетку.*

Вариант ответа:

Важнейшая группа антибиотиков, образуемых грибами (пенициллины и цефалоспорины), объединена под общим названием β-лактамов. Плесневые грибы как продуценты β-лактамов относятся к многочисленным почвенным микроорганизмам-эукариотам, имеющим окруженное мембраной ядро. β-Лактамы образуются двумя родами плесневых грибов: *Penicillium* (пенициллины) и *Cephalosporium* (цефалоспорины) или *Acremonium*. Широко известны два продуцента β-лактамов: *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium chrysogenum*. Первый образует бензилпенициллин, второй - цефалоспорин С. У пенициллинов с β-лактамовым кольцом сконденсировано пятичленное кольцо, а у цефалоспоринов - шестичленное.

Предназначение антибиотиков в почвенных биоценозах: средства выживания в борьбе за питательные вещества и т.п., антистрессорные средства, эффекторы образования мицелия или спорообразования.

Механизм биосинтеза. Предшественники β-лактамов - аминокислоты, которые в результате ферментативных реакций преобразуются в β-лактамовую структуру. Началом формирования β-лактамовой структуры считают синтез LLD-трипептида из трех L-аминокислот: L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина. В образовании LLD-трипептида участвуют специфические ферменты, замыкающие пептидные связи и ферменты,

превращающие L-валин в его оптический антипод - D-валин. Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический β -лактам. Следующий этап - появление серосодержащего пятичленного кольца, сконденсированного с β -лактамным.

Задача 22

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества антибиотиков. Ряд представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora* образуют антибиотики аминогликозидной структуры. Кроме природных аминогликозидов, в медицинской практике используют также синтетические аминогликозидные антибиотики.

Проанализируйте аминогликозидные антибиотики, исходя из:

- *их сравнительной характеристики в соответствии со структурой, биологической активностью и практическим применением;*
- *отличия актиномицетов от бактерий и грибов;*
- *механизма действия, выделяя при этом наиболее токсичные структуры.*

Вариант ответа:

Особенность актиномицетов заключается в том, что они в эволюционном отношении ближе к бактериям (прокариотам). Клеточная стенка актиномицетов состоит из гетерополимера - пептидогликана. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*, образуют природные антибиотики: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и др. с широким спектром антибактериального действия. Кроме природных, в клинической практике используют также и полусинтетические аминогликозидные антибиотики.

Молекула антибиотиков макролидной структуры содержит макроциклическое лактонное кольцо, соединенное с сахарами и/или аминами. Антибиотики сложной анзамициновой структуры (*Streptomyces mediterranei*) с нафталиновым ядром и длинной алифатической цепью, соединенной с ароматической частью эфирной и амидной связью, представлены полусинтетическим антибиотиком рифампицином. Представители рода *Streptomyces* (*Streptomyces novisei*) образуют полиеновые антибиотики (полиеновые макролиды). Актиномицеты образуют и противоопухолевые антибиотики: блеомицин - гликопептид (*Streptomyces verticillius*).

Задача 23

Весьма существенную роль для продвижения антибиотика в производственную сферу играет возможность проведения сравнительной идентификации антибиотика на начальных этапах исследования в части их функциональной активности как антибактериальных ЛС.

В условиях поставленной задачи предложите:

- *методы и варианты проведения сравнительной идентификации, оценку антимикробной активности антибиотика;*
- *способы выделения антибиотика из культуральной жидкости;*
- *проведение количественной оценки.*

Вариант ответа:

Существуют два варианта определения антимикробной активности по методу диффузии в агар с последующим сравнением размеров зон угнетения роста тест-организмов при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата.

Способы выделения антибиотика зависят от его локализации. Это может быть и культуральная жидкость, и мицелий или и то, и другое вместе. Если антибиотик находится в мицелии, его стремятся перевести в водную фазу, меняя, к примеру, рН культуральной жидкости (например, в случае тетрациклинов). Кроме того, можно объединить растворенный антибиотик в общем осадке, из которого его затем экстрагировать. Экстракцию применяют при очистке таких антибиотиков, как пенициллин, эритромицин. Для количественной оценки используют практически все традиционные физико-химические методы анализа. При обезвоживании препаратов антибиотиков используют либо лиофильную сушку (замороженного стерильного раствора, разлитого во флаконы в вакууме), либо распылительную сушку. Все серии лекарственных форм контролируют в соответствии с Государственной фармакопеей или соответствующими производственными регламентами с учетом требований международных фармакопей.

Задача 24

Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности - это система устройств периодического или непрерывного действия. С позиции

системного подхода можно реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам этого производства во взаимосвязи всех слагаемых процесса.

В свете представленных задач производственного процесса при анализе ситуации приведите:

- технологическую схему производства с разделением ее на подготовительную и основную части и их краткой характеристикой;
- классификацию биосинтеза по технологическим параметрам;
- реализацию системного подхода в зависимости от цели и поставленной задачи с выбором типа ферментационного процесса.

Вариант ответа:

Биотехнологическое производство ЛС и БАВ строится на использовании исходного сырья, энергетики, реализованного труда, биообъектов, процессов и аппаратов. В условиях такого производства технология делится на ряд подготовительных и основных этапов.

Процессы ферментации (биосинтеза) можно классифицировать по технологическим параметрам, например по организации материальных потоков.

К этим процессам относятся:

- Периодический (задаются и остаются без изменений все параметры ферментации - температура, рН, обороты мешалки).
- Полупериодический (регулируемая ферментация).
- Непрерывный процесс. В процессе биосинтеза отбирают небольшую часть культуральной жидкости (10-15%) и переносят в другой ферментер.
- Многоциклический процесс отличается тем, что в конце ферментации 90% культуральной жидкости сливают из ферментера, а оставшаяся часть выполняет роль посевного материала.

При выборе типа ферментации в зависимости от поставленной задачи имеет существенное значение, что является целевым продуктом: первичные или вторичные метаболиты. Критерием в выборе типа ферментации (поверхностная или глубинная) служат также объемы производства.

Задача 25

Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства требует создания стерильных

условий при многостадийности всего процесса в целом. При этом для успешного осуществления биосинтеза необходимо не допустить контаминации целевого продукта.

В условиях поставленной задачи укажите:

- в чем выражается многостадийность биосинтеза;
- способы предотвращения контаминации целевого продукта;
- схему очистки воздуха, используемую в процессе биосинтеза.

Вариант ответа:

Многостадийность биосинтеза выражается в выращивании посевной среды (многоэтапность), в приготовлении соответствующей питательной среды многокомпонентного состава, в самом процессе ведения биосинтеза (биокатализа), в выделении, очистке, концентрировании, сушке, фасовке и упаковке ЛС. Биосинтез осуществляют с использованием жидкой питательной среды, при глубинном культивировании. Стерилизацию воздуха производят методом фильтрации.

Питательную среду стерилизуют с применением термического нагревания (в 1 г. кукурузной муки содержится от 10⁴ до 10⁹ клеток микроорганизмов).

Задача 26

Несмотря на то, что в основе современной инженерной энзимологии лежит применение ферментов и ферментных систем, технологическое использование ферментов имеет вполне конкретные ограничения: лабильность ферментов, дороговизна и большая трудоемкость при их очистке, однократность их использования, в ряде случаев наличие коферментов.

Проанализируйте ситуацию с обоснованием:

- путей преодоления этих ограничений;
- сопоставления функции биообъекта с технологической операцией;
- понятия «система, открытая для усложнения».

Вариант ответа:

Сама иммобилизация представляет собой физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, т.е. биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты метаболизма свободно обмениваются между

биообъектом и растворителем. Биообъект в этом случае работает многократно (недели, месяцы). При совершенствовании биотехнологического процесса обычно используют несколько методов иммобилизации ферментов.

В результате иммобилизации ферменты получают преимущества гетерогенных катализаторов. Что касается широко используемой иммобилизации целых клеток, то ее проводят аналогично, предотвращая размножение клеток, увеличивая их сохранность и срок работы в качестве катализатора.

Каждый из методов иммобилизации имеет свои ограничения, связанные с недостаточной прочностью получаемых связей. Особенно это касается микрокапсулирования (инкапсулирования). Функции биообъекта связаны с технологической операцией определенным образом.

Задача 27

Правила GMP - руководящий нормативный документ международного значения, который должны обязательно принимать к сведению как отдельные фирмы, так и все производители фармацевтических препаратов в целом. Это правила организации и контроля производства, которые составляют единую систему требований к качеству выпускаемой продукции. Все производства, интегрированные в международный рынок ЛС и медицинских препаратов, выпускающие готовые лекарственные формы и любую продукцию медицинского назначения, включая субстанции, обязаны работать по этим правилам. В то же время каждая страна, производящая ЛС, имеет свою Государственную фармакопею как руководящий документ проверки качества той или иной медицинской продукции.

Проведите сравнительный анализ:

- *правил GMP и государственных фармакопей с позиций требований для экспорта фармацевтической продукции;*
- *необходимости проведения валидации как любого фармацевтического производства, так и биотехнологической продукции в частности;*
- *правил международного значения для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС.*

Вариант ответа:

Правила GMP - правила организации производства и контроля качества ЛС,

единая система требований к производству и контролю, руководящий нормативный документ для производителей и фирм, выпускающих ЛС, для всей продукции медицинского назначения и субстанций. Внедрение этой системы приносит выгоду импортерам и имеет значительные преимущества для экспортеров, так как является гарантией высокого качества предлагаемой продукции при соблюдении определенных требований.

В перечне разделов правил GMP особое место занимает раздел валидации. Валидация - оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям. Валидация бывает периодической и внеплановой и оценивает как сам производственный процесс, так и пределы его возможностей. На биотехнологическом производстве внеплановую валидацию проводят, если производство меняет штамм продуцента или изменена питательная среда (меняется метаболизм продуцента и возможно появление нежелательных примесей).

Для получения достоверных данных о проведенных испытаниях и безопасности ЛС используют правила GLP - правила организации лабораторных исследований. Правила GCP - правила организации клинических испытаний с соблюдением прав больных и добровольцев, с созданием общественных и этических комитетов по контролю клинических испытаний лекарственных препаратов.

Задача 28

Иногда в клиниках или больницах наблюдается явление внутрибольничной инфекции, когда успешно применяемые антибиотики перестают оказывать терапевтическое действие, вызывая явление антибиотикорезистентности.

В условиях этой проблемы:

- *проанализируйте ситуацию, когда гены резистентности присутствуют у почвенных микроорганизмов-продуцентов антибиотиков и могут передаваться патогенным микроорганизмам;*
- *сравните хромосомную и плазмидную локализацию структурных генов β -лактамаз;*
- *предложите пути преодоления этой резистентности на примере β -лактамов*

и цефалоспоринов.

Вариант ответа:

Первоисточник генов резистентности - почвенные микроорганизмы-продуценты антибиотиков. Вместе с тем развитие резистентности может быть связано с генами, кодирующими синтез ферментов деградации собственного антибиотика, которые способны переноситься из микроорганизмов-продуцентов антибиотиков в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Таким образом, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков, а формирование в бактериальной клетке защитных механизмов обусловлено появлением генов резистентности как в хромосомах, так и в плазмидах.

Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы сразу несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Такое явление носит название «полирезистентность микроорганизмов». В то же время необходимо отметить, что в большинстве случаев переноса генов резистентности не происходит.

Пути преодоления резистентности (на примере β -лактамов и цефалоспоринов):

- применение полусинтетических антибиотиков (оксациллин, метициллин и др.);
- применение антибиотиков - ингибиторов β -лактамаз (уназин - ампициллин + сульбактам, амоксиклав - амоксициллин + клавулановая кислота);
- β -лактамный антибиотик имипинем (легко проникает через пориновые каналы);

Задача 29

Биотехнологические методы получения ЛС на основе культур клеток растений имеют широкое распространение, поскольку по сравнению с получением биомасс растительных культур из дикой природы или с плантаций эти методы отличаются высокой рентабельностью, экологичностью, независимостью от географии и климата произрастания того или иного растения, а также обеспечивают высокое качество целевого продукта, стабильность производства и возможность управления процессами (автоматизацию). Все

вышеперечисленное указывает на высокую перспективность дальнейшего развития данных методов.

Анализируя данную ситуацию:

- *представьте технологии получения лекарственных препаратов растительного происхождения с конкретными примерами, обращая внимание на специфику растительных клеток, фазы роста, питательные среды, условия ферментации и типы биореакторов;*
- *сопоставьте стабильность процесса по выходу вторичных метаболитов с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (фазы роста клеток);*
- *предложите метод использования ферментов для превращения дигитоксина в дигоксин (последний менее токсичен и поэтому его применяют в качестве сердечного препарата - карденолида).*

Вариант ответа:

Метод биотехнологии получения ЛС на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани или каллуса. Каллус - ткань, возникающая при неорганизованной пролиферации клеток растения (дедифференцированное деление клеток). Стабильность по выходу целевого продукта (вторичных метаболитов) обычно связывают с дифференцировкой клеток и со стадией культивирования (конец экспоненциальной стадии с переходом на постоянную фазу роста и деления клеток).

Примером влияния дифференцировки клеток на выход целевого продукта служит дифференцированный корневой каллус *Atropa belladonna*, синтезирующий тропановые алкалоиды (в отличие от недифференцированного). Другой пример: только недифференцированные клетки *Rauwolfia serpentine* синтезируют индолиловые алкалоиды. В питательную среду, помимо микро- и макроэлементов, источников углерода, витаминов, нужно вносить регуляторы роста растений.

Суспензионное культивирование осуществляют в аэрлифтных ферментерах без механической мешалки (с турбинным перемешиванием, с внешней циркуляционной петлей).

Задача 30

В настоящее время существует проблема недостаточной эффективности хорошо зарекомендовавших себя ранее ЛС (это и β -лактамы препараты, и цефалоспорины I, II, III поколения) вследствие развития к ним антибиотикорезистентности, что в конечном счете приводит к необходимости постоянного поиска новых антимикробных ЛС. Антибиотикорезистентность может возникнуть в результате изменения конформации внутриклеточной мишени, изменения проницаемости мембраны бактериальной клетки, ферментативной инактивации антибиотиков, активного (энергозависимого) выброса антибиотиков.

Проведите анализ β -лактамов и аминогликозидных антибиотиков (на конкретных примерах), имеющих широкое применение в клинической практике, с точки зрения:

- *механизма возникновения резистентности;*
- *сравнения хромосомной и плазмидной резистентности и роли конъюгативных транспозонов в этом процессе;*
- *возникновения полирезистентности микроорганизмов и госпитальной инфекции.*

Вариант ответа:

К источникам генов резистентности относятся гены, кодирующие синтез ферментов собственного антибиотика: они также способны переноситься из продуцентов в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Формирование в бактериальной клетке защитных механизмов обусловлено наличием генов резистентности как в хромосомах, так и в плазидах. Также транспозоны могут нести детерминанты устойчивости к антибиотикам (например, к канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, эритромицину). Иногда в одной плазмиде оказываются локализованы несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Полирезистентные штаммы возбудителей инфекций вызывают «госпитальную инфекцию», когда к антибиотикам, которые применяют в клиническом учреждении, возникает устойчивая резистентность со стороны возбудителей.

Ферментативная инактивация аминогликозидов - наиболее часто встречающийся механизм резистентности к этим антибиотикам. Активный

выброс антибиотиков из клетки возможно показать на примере тетрациклинов и противоопухолевых препаратов. Система активного выброса локализуется в цитоплазматической мембране клетки и не позволяет антибиотикам достигать своей мишени, делая их неэффективными.

Задача 31

Важнейшие группы антибиотиков, образуемых грибами, пенициллины и цефалоспорины, известны также под общим названием β -лактамы. Они образуются двумя родами плесневых грибов, среди которых наиболее широко известны два продуцента β -лактамов. Структура, от которой зависит их антимикробная активность, это весьма реакционно-способное четырехчленное β -лактамное кольцо (циклический амид). В этом кольце происходит замыкание связи между углеродом карбоксильной группы аминокислоты и азотом аминогруппы при β -углеродном атоме. На основе природных пенициллинов и цефалоспоринов получены также и их полусинтетические аналоги.

Проведите анализ β -лактамных антибиотиков с позиций:

- механизма образования (биосинтеза) на примере пенициллина;
- химической структуры, биологической активности и механизма действия;
- требований к производству этих антибиотиков согласно правилам GMP.

Вариант ответа:

Предшественники β -лактамных антибиотиков - аминокислоты, преобразование которых путем ферментативных реакций ведет к формированию β -лактамной структуры. Сначала из трех аминокислот, L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина, L-валина, синтезируется LLD-трипептид. В его образовании участвуют специфические ферменты, замыкающие пептидные связи и ферменты, превращающие L-валин в его оптический антипод - D-валин.

Биологическая активность антибиотиков (бактериостатический, бактерицидный, а иногда и литический эффект на клетки) как избирательных ингибиторов метаболизма бактериальной клетки осуществляется посредством их взаимодействия с внутриклеточной мишенью, что вызывает также каскад вторичных реакций.

β -Лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и другие вещества β -

лактамной структуры) относятся к ингибиторам образования клеточной стенки бактерий вследствие избирательного подавления активности тех или иных ферментов, включенных в многоэтапный синтез основного полимера клеточной стенки - пептидогликана. В животных клетках нет пептидогликана. Для производства антибиотиков β -лактамной структуры в соответствии с правилами GMP требуется полная изоляция этого производства от производства других лекарственных препаратов.

Задача 32

В настоящее время доказано, что невозможно полностью избавиться от генов резистентности, однако бороться с антибиотикорезистентностью можно.

Обоснуйте необходимость периодического обновления номенклатуры антибиотических препаратов на основе:

- *целенаправленной химической трансформации природных антибиотиков на примере β -лактамных и аминогликозидных антибиотиков;*
- *информации о системах активного выброса антибиотиков из клетки;*
- *данных о MDR, об образовании инактивирующих антибиотика изоферментов, о фенотипах опухолей и возможности борьбы с резистентностью опухолей.*

Вариант ответа:

Представителями таких ЛС являются полусинтетические антибиотики (оксациллин, метициллин, карбенициллин и т.д.), которые не чувствительны к пенициллазам. Механизм создания полусинтетических пенициллинов:

- *отщепление бензильного радикала (остается 6-АПК);*
- *введение химическим путем других радикалов.*

Аналогичная работа возможна с цефалоспоридами при присоединении различных радикалов к 7-аминоцефалоспороновой кислоте.

Если резистентность обусловлена наличием генов клетки, которые делают мембраны непроницаемыми для антибиотика (сужаются поры или снижается их количество), то в этом случае можно использовать β -лактамные антибиотики имипинем, карбопинем, веропинем, образующие, по сравнению с пенициллином, меньшие по размерам цвиттер-ионы, легко проникающие через пориновые каналы.

Система активного выброса антибиотиков обнаруживает в цитоплазматической

мембране новые белки, проникающие в клетку.

Задача 33

У патогенных микроорганизмов открыты гены, существенные для инфекционного процесса, но не существенные при росте на искусственных питательных средах (*in vitro*). Эти гены (*ivi*-гены или гены вирулентности) не поддаются идентификации и, таким образом, не могут быть использованы как таргеты (мишени) при поиске новых антибактериальных ЛС.

Докажите существенность гена-мишени при поиске новых ЛС, используя понятия:

- «*house keeping gens*» («гены домашнего хозяйства», «гены, на которых держится дом»);
- «*ivi-gens*»;
- «система *IVET*» как часть международных геномных исследований.

Вариант ответа:

Большинство генов, продукты которых необходимы клетке всегда, получили название «*house keeping gens*», что можно перевести, как «гены, на которых держится дом». Они экспрессируются в любых условиях, так как клетка без них не может существовать. Продукты экспрессии именно этих генов обнаруживают на питательных средах *in vitro*, поэтому практически все антибиотики, применяемые в клинической практике, являются ингибиторами функций именно этих генов.

Продукты некоторых генов не идентифицируют на питательных средах, и поэтому их дальнейшее использование в качестве таргетов при поиске новых ЛС невозможно. Эти, так называемые, молчащие *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название *ivi*-генов или генов вирулентности. Значительный интерес представляют пути выявления и выделения этих генов. Примером такой работы служит предложенный американскими генетиками метод «*IVET*» (*In Vivo Expression Technology*). Краткая суть метода:

- Геном патогенной бактерии (например, *Salmonella typhimurium*) с помощью рестриктаз делят на сотни фрагментов ($x_1, x_2, x_3 \dots x_n$).
- Каждый отдельный фрагмент генно-инженерными методами соединяют с лишенным промотора геном хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*). Такой ген

(без промотора) не может реплицироваться при его введении в клетку.

- К этому сдвоенному фрагменту (x-cat, где x - фрагмент генома сальмонеллы, а cat - ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы) присоединяется лактозный оперон (lac Z) также без промотора.
- Полученный фрагмент (x-cat-lac Z) включается в плазмиду. При этом получается набор плазмид, отличающихся только по фрагменту x.
- Полученные плазмиды вводят в клетку E. coli.
- Далее в организм лабораторного животного (мыши) вводят клеточную суспензию E. coli и хлорамфеникол.
- Через сутки из слизистой оболочки желудка мыши на твердую индикаторную среду с лактозой высевают бактериальную культуру.
- Затем колонии анализируют.

Задача 34

В основе любого производства фармацевтических препаратов, в том числе и биотехнологического, должна быть заложена рентабельность, стабильность, высокий уровень качества. Вместе с тем ЛС должны быть эффективны и безопасны при применении.

Проанализируйте целесообразность достижения поставленных целей на примере:

- сочетания биосинтеза и органического синтеза при производстве β -лактамов и аминогликозидов;
- производства D-циклосерина, аминокислот, витаминов;
- производства хлорамфеникола (левомицетина).

Вариант ответа:

Любое фармацевтическое производство по способу получения целевого продукта подразделяется на химическое, биологическое, химико-энзиматическое, микробиологическое (широко применяется различное сочетание этих методов).

Примером выгодного сочетания органического синтеза и биосинтеза является производство аскорбиновой кислоты, в котором этап превращения D-сорбита в L-сорбозу осуществляется уксуснокислыми бактериями *Gluconobacter oxydans*. Или, например, можно привести получение ампициллина и других

полусинтетических антибиотиков β -лактамной структуры (оксациллин, карбенициллин, метициллин и др.) из пенициллина (антибиотик, образуемый плесневыми грибами *Penicillium chrysogenum*). Здесь же можно привести пример преобразования аминогликозидных антибиотиков (например, канамицина) с целью получения новых ЛС методом мутасинтеза. Сначала генетики-биотехнологи получают штамм «блок-мутант».

Задача 35

Витамины как группа незаменимых органических соединений различной химической природы необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. С помощью биотехнологии сегодня можно получать в необходимых количествах такие витамины, как В₂, В₁₂, β -каротин, витамин РР, эргостерин, аскорбиновую кислоту.

Проведите сравнительный анализ получения вышеуказанных витаминов с помощью биотехнологии, принимая во внимание:

- *биообъекты, которые используются в каждом конкретном случае;*
- *получение суперпродуцентов рибофлавина и витамина В₁₂;*
- *преимущества биотехнологического производства витаминов.*

Вариант ответа:

Известно, что высокой биологической активностью часто обладают не сами витамины, а их производные - коферменты. Например, для рибофлавина характерно функционирование в двух коэнзимных формах: флавиномононуклеотида и флавинадениндинуклеотида. Активным продуцентом рибофлавина является культура дрожжеподобного гриба *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*. Сверхсинтеза рибофлавина достигают при использовании мутагенов для нарушения механизма ретроингибирования у продуцентов.

Продуцентом витамина В₁₂ являются пропионовые бактерии, продуктивность которых резко повышается при добавлении в среду предшественника витамина В₁₂ - 5, 6-диметилбензинзимидазола и использовании мутантных штаммов.

Продуцентом кофермента НАД являются пекарские дрожжи. Выход НАД значительно увеличивается при добавлении в среду предшественников (аденина

и никотинамида).

При производстве аскорбиновой кислоты используют биотрансформацию D-сорбита в L-сорбозу уксуснокислыми бактериями.

В качестве промышленного источника эргостерина применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Задача 36

Особенно заметно достоинства биокатализаторов проявляются при модификации пространственной структуры стероидных соединений. Долгое время микробиологическая трансформация относилась исключительно к специфическим методам химии стероидов. Внедрение методов микробиологического синтеза для получения БАВ различной химической структуры вызвало бурное развитие фармацевтической промышленности, позволив многократно удешевить ценные лекарственные препараты.

Проанализируйте возможность биоконверсии (биотрансформация, биокатализ) на примере получения гормональных препаратов гидрокортизона и преднизолона с выбором:

- источников сырья для производства ЛС стероидной структуры;
- основных реакций биотрансформации;
- технологических параметров ферментационного процесса.

Прокомментируйте явление сочетания высокого выхода целевого продукта по субстрату в процентном отношении и низкой производительности ферментации.

Вариант ответа:

При микробиологической трансформации ситостерина путем окисления боковой цепи стерина мутантными штаммами *Mycobacterium vaccae* образуется 17-кетоандростан. Полученный 17-кетоандростан при помощи химических методов превращают в ЛС, например, тестостерон и его эфиры - метилтестостерон, оксипрогестерон и др.

Ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит вещество Рейхштейна, которое биотрансформируется культурой *Corynebacterium mediolanum*.

Основные реакции биотрансформации. При получении кортизона - это 11-α-

гидроксигирование с использованием гриба *Rhizopus nigricans*, далее, дегидрогенизацией кортизона и гидрокортизона с помощью бактерий и актиномицетов можно получать преднизолон.

Повышения растворимости стероидов достигают механическим и ультразвуковым измельчением, повышением водорастворимости стероидов.

Задача 37

Наукоемкое и высокоэффективное биотехнологическое производство, являясь малоэнергосодержащим, дает возможность значительно уменьшать количество отходов, при этом самих природных ресурсов расходуется незначительное количество. Так, потребление ресурсов (энергии) составляет всего 0,6–1% от всей промышленности, потребление воды - 0,01%, выброс вредных веществ в атмосферу также невелик. Вместе с тем огромное значение биотехнология имеет в поддержании экологического равновесия в природе, несмотря на агрессивную политику человека в ее отношении в целом.

Учитывая приведенную информацию, проанализируйте использование биотехнологии в решении экологических задач в части:

- совершенствования самого биотехнологического производства;
- очистки газообразных, жидких и твердых отходов;
- использования «активного ила» и «штаммов-деструкторов».

Вариант ответа:

Направления совершенствования биотехнологического производства:

- совершенствование технологических параметров биосинтеза
- совершенствование методов выделения
- соблюдение правил GMP

Экологические проблемы биотехнологии: уничтожение твердых отходов (биомассы продуцента), очистка жидких отходов (культуральная жидкость), ликвидация газообразных отходов.

Очистка жидких отходов (культуральная жидкость) - это система, состоящая из нескольких последовательных блоков. На этой стадии 80-90% органических веществ под воздействием микроорганизмов преобразуется в «активном иле» аэротенка. Затем снова аэротенк и блок доочистки с биофильтрами, где происходит полная деструкция трудноокисляемых соединений.

Задача 38

Востребованность препаратов на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов (нормофлоры, пробиотики) не вызывает сомнений. Эта продукция относится к чисто биотехнологическому производству, а рынок таких препаратов имеет тенденцию к расширению и даже в какой-то степени конкурирует с антибиотиками.

Охарактеризуйте препараты живых культур микроорганизмов, учитывая:

- *свойства микроорганизмов, служащих основой для получения пробиотиков и требования к биообъектам в условиях промышленного производства;*
- *особенности ферментации (режим, продолжительность, оптимальные фазы роста);*
- *особенности их применения (виды препаратов, параметры стандартизации и возможность сочетания с антибиотиками).*

Вариант ответа:

Пробиотики - живые микроорганизмы и/или вещества микробного либо иного происхождения, оказывающие благоприятные эффекты.

Технология получения таких препаратов предполагает наличие штаммов микроорганизмов-симбионтов. Эти штаммы должны обладать высокой антагонистической активностью. Штаммы проверяют на патогенность и токсичность *in vitro*. Штаммы должны быть криорезистентны. В условиях промышленного производства штаммы рассеивают и получают отдельные колонии, которые пересевают на агаризованные или жидкие питательные среды.

Препараты пробиотиков: колибактерин на основе кишечной палочки; бифидумбактерин на основе штамма *Bifidobacterium bifidum*; бификол - смесь *Bifidobacterium bifidum* и *E. coli* - и др.

Применение: в педиатрии, в инфекционной клинике, при длительных кишечных расстройствах, дисбактериозах, при антибиотикотерапии. Стандартизацию препаратов-пробиотиков проводят на соответствие паспортным данным штамма, при этом побочные эффекты должны отсутствовать даже при применении препаратов в избыточных дозах.

Задача 39

Аминокислоты известны как составные элементы белков. Биологически

активными являются только L-стереоизомеры аминокислот. Чистые L-аминокислоты находят свое применение в медицине в качестве или самостоятельных лечебных препаратов (L-метионин), или в составе смесей для парентерального питания, и в фармацевтической промышленности при синтезе различных ЛС. Используют их и как добавки при коррекции питания. Аминокислоты получают различными способами: биологическим, химическим, химико-энзиматическим, микробиологическим. В настоящее время аминокислоты как ЛС завоевали себе определенный и довольно значительный сегмент от общего объема фармацевтической продукции.

С учетом представленной информации проведите сравнительный анализ:

- *предложенных методов получения аминокислот на конкретных производствах;*
- *выбора микроорганизмов-биообъектов для создания штаммов-суперпродуцентов;*
- *особенностей подбора питательных сред с учетом ферментативной регуляции биосинтеза на клеточном уровне.*

Вариант ответа:

При получении аминокислот применяют различные методы:

- Биологический метод (гидролиз белок-содержащих субстратов) наиболее дешевый.
- Химический синтез: образуется смесь D и L-изомеров. Производство аминокислоты (глицина) и метионина данным методом рентабельно (в первом случае из-за отсутствия изомеров, во втором - вследствие равной терапевтической активности изомеров).
- Химико-энзиматический метод проводят в 2 этапа. Сначала химически синтезируют предшественник аминокислоты, например карбоновую кислоту, а затем осуществляют биотрансформацию предшественника ферментами живых клеток.
- Микробиологический метод. Обязательным условием возможности его использования является наличие штаммов-суперпродуцентов аминокислот.

Критерии отбора биообъектов для создания промышленных штаммов:

Прежде всего, получение ауксотрофных мутантов, что предполагает

использование только тех микроорганизмов, которые имеют разветвленный путь биосинтеза по крайней мере двух аминокислот.

Задача 40

Иммунобиотехнология вносит весомый вклад в создание ЛС, профилактических и диагностических препаратов. Однако не у всех людей и не всегда иммунная система обеспечивает защиту организма от различных микробных и вирусных инфекций. Она может быть неадекватна внешним условиям и иногда требуется помощь в усилении иммунного ответа.

При анализе данной ситуации:

- сопоставьте виды и цели иммунизации с классификацией вакцин по способам их получения и применению;
- свяжите атакующие агенты (ксенобиотики) с ответной реакцией организма, используя понятия «антиген», «антитело», «антигенные детерминанты» («эпитопы»), «гаптены»;
- прокомментируйте проявление иммунного ответа и способы его усиления.

Вариант ответа:

Вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живых гибридных носителей вызывают активную иммунизацию посредством возникновения в организме человека или животного антител, вызывающих блокировку пролиферации патогенного микроорганизма, что не позволяет развиваться заболеванию. Далее, можно отметить рекомбинантные вакцины (выделенный ген вируса вставляют 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.

В молекулярных вакцинах антиген находится в виде фрагментов его молекул.

Задача 41

Вакцины и сыворотки, как известно, применяют с целью профилактики или лечения. Вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и тем самым защищает его от инфекции. В случае

введения сыворотки организм получает уже готовые антитела.

Сопоставьте вакцины и сыворотки как профилактические средства:

- по иммунному ответу;
- по способу получения и применению;
- по эффективности их использования.

Вариант ответа:

Благодаря сыворотке организм человека защищен пассивным иммунитетом, соответственно готовыми антителами. В случае введения вакцины организм человека в ответ на полученный антиген сам вырабатывает антитела. Технология получения сывороток, в отличие от вакцин, несложна. Вначале выделяют плазму крови, потом удаляют из нее фибрин. Это один способ получения сыворотки. Можно получать сыворотки из культивируемых животных клеток, однако здесь главной проблемой является обеспечение стабильного роста животных клеток. Помимо этого существуют такие проблемы роста животных клеток, как генетическая нестабильность, непостоянство генетических экспрессий, старение. Питательные среды должны содержать аминокислоты, белки, липиды, углеводы, витамины, глюкозу, предшественники простагландинов, неорганические соли, микроэлементы. Процесс замораживания может иметь негативные последствия.

Задача 42

Известно, что главным компонентом иммунохимической реакции являются антитела (иммуноглобулины), представляющие собой белки сыворотки крови, синтезируемые в организме человека в качестве проявления защитной реакции (иммунитета) при попадании в него чужеродного вещества (ксенобиотика).

Сопоставьте функции иммуноглобулинов (антител):

- с их классификацией и структурой;
- со схемой взаимодействия антигена с антителом, представлением о структуре антигена;
- с принципами расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов.

Вариант ответа:

Основной элемент структуры антител - четырехцепочечная молекула,

состоящая из двух пар идентичных полипептидных цепей. К тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахаридные фрагменты. Именно они и определяют биологические свойства иммуноглобулинов. Вариабельные домены легких и тяжелых цепей образуют активный центр антител соответствующей специфичности. Низкомолекулярные соединения, в частности лекарственные вещества, сами по себе не могут вызывать образование антител. Однако если они присоединяются к макромолекуле, организм начинает вырабатывать к ним антитела. На первой стадии иммунохимической реакции происходит «склеивание» антигена и антитела, а вторая идет с образованием комплексов сложного состава, что определяется помутнением раствора, либо выпадением осадка. Для расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов в один из компонентов системы вводят маркер.

Задача 43

Очевидно, что биосинтез ЛС необходимо проводить в асептических условиях. Тем не менее, проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных при производстве ЛС. В этом случае можно обратиться к радиационной стерилизации ЛС.

Предложите выбор радиационной стерилизации фармацевтических препаратов на конкретных примерах, используя ваши представления:

- *о видах и дозах облучения, режиме стерилизации, установках;*
- *о лекарственных формах, разрешенных для этого вида стерилизации;*
- *о причинах влияния облучения на внешний вид порошка и стеклянную тару.*

Вариант ответа:

В реальных условиях радиационную или лучевую стерилизацию применяют на отдельных производствах. Разрешенными для стерилизации ЛС являются γ -лучи изотопа кобальта (Co^{60}) и быстрые электроны с энергией не выше 5 млн. эВ (электронвольт), получаемые на ускорителях при отсутствии наведенной радиации у обработанных лекарственных препаратов (нет расщепления атомного ядра). Лучевая стерилизация обеспечивает необходимый результат, при этом лекарственные препараты сохраняют свою активность и

удовлетворяют фармакопейным тестам. Внешний вид облученных препаратов может меняться, например белые порошки теряют блеск и приобретают матовый оттенок.

Существует опыт применения такой стерилизации на примере антибиотиков. Порошки красного цвета (актиномицины) и желтого (тетрациклины) становятся более тусклыми, но обладают прежней активностью. При стерилизации природных и полусинтетических пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов снижения активности также не происходит.

Задача 44

На сегодняшний день производство иммунодиагностикомов можно рассматривать как самостоятельную область биотехнологической промышленности. Моноклональные антитела диагностического назначения, получаемые с использованием гибридной технологии, представлены широким ассортиментом наборов фармацевтической продукции во всем мире. Иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов.

Учитывая большой спектр использования иммунохимического анализа:

- *выберите наиболее важные области его применения;*
- *представьте схему получения моноклональных антител;*
- *приведите пример использования тест-системы иммунохимического анализа в общей схеме экспресс-анализа хорионического гонадотропина.*

Вариант ответа:

Самые важные области применения иммунохимического анализа - контроль банков крови, обнаружение возбудителей во внешней среде и др. Иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов.

Схема получения моноклональных антител:

Каким-либо синтетическим конъюгированным антигеном иммунизируют мышей. Затем лимфоциты из селезенки мыши сливают с помощью ПЭГ с клетками стабильной миеломной линии. Из полученных гибридных клеток отбирают только те, которые унаследовали способность к неограниченному росту. Их культивируют и получают клон клеток, продуцирующих антитела к

лекарственному препарату. При определении хорионического гонадотропина методом твердофазного ИФА на полистирольные шарики сорбируют моноклональные антитела к хорионическому гонадотропину.

Задача 45

Биотехнологическое производство в фармацевтической промышленности - это система устройств периодического или непрерывного действия. С позиции системного подхода можно реально оценить соответствие конкретного устройства целям и задачам конкретного производства во взаимосвязи всех слагаемых процесса.

В свете представленных задач производственного процесса при анализе ситуации используйте особенности:

- конструкции ферментера («обвязка ферментера»);
- систем регуляции процесса, устройств теплосистем и массообмена;
- устройств систем аэрации.

Вариант ответа:

Объем ферментационных аппаратов для промышленного производства, например антибиотиков, колеблется от 1 до 150 м³. Цилиндрическая поверхность снабжена так называемой тепловой рубашкой, представляющей собой систему змеевиков для обеспечения постоянной температуры. В нижней части аппарата имеются отбойники.

Выращивание посевного материала проходит в отдельном ферментере - инокуляторе. Современные ферментеры снабжены контрольно-измерительной аппаратурой. Важность аэрации на стадии ферментации обусловлена тем, что большинство используемых микроорганизмов-продуцентов являются аэробами. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности, что требует регулирования скорости подачи воздуха в аппарат. Регуляцию осуществляют по совокупности параметров, характеризующих метаболическую активность культуры. Кроме того, добавление компонентов питательной среды ведет к значительному разбавлению культуральной жидкости и увеличению ее объема в ферментере.