

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ

1. Проанализируйте преимущества биотехнологического производства витаминов на конкретных примерах.

Ответ: Например, *Витамин D* - это группа родственных соединений, в основе которых находится эргостерин, который обнаружен в клеточных мембранах эукариот. При недостатке в организме гормона 1,25-дигидроксихолекальциферола, предшественником которого является витамин D₂ у детей развивается рахит (аналог рахита у взрослых - остеопороз). В качестве средств коррекции этих состояний применяются созданные биотехнологическим путем лекарственные препараты витамина D. Наиболее активные продуценты эргостерина – *Saccharomyces, Rhodotoryla, Candida*. В промышленных масштабах эргостерин получают при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах с избытком сахаров при дефиците азота, высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. При получении кристаллического препарата витамина D₂ культивируют плесневые грибы (*Penicillium, Aspergillus*).

2. Для эффективного проведения биотехнологического процесса большое значение имеет питательная среда, в которой микроорганизмы-продуценты БАВ используют в качестве источника азота различные азотсодержащие соединения, содержащие аминный азот или ионы аммония. Какие условия проведения ферментации по источнику азота при получении антибиотиков будут являться оптимальными?

Ответ: Аммоний и другие легко утилизируемые источники азота подобно легкоокисляемым углеводам усиливают рост продуцентов бета-лактамов, полиеновых антибиотиков (эритромицина, рифамицинов и др.), но отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, БВК (белково-витаминный концентрат) медленно расщепляются в процессе ферментации, т.е. из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов питательных сред, что позволяет получать высокий выход антибиотиков. У продуцентов бета-лактамов механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков связан с уровнем глутаминсинтетазы в мицелии. Известно, что глутамин является донором аминных групп для ряда аминокислот, а сами аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками бета-лактамовых антибиотиков. Вероятно, что у разных продуцентов механизм этого действия на биосинтез различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез обязательно учитывается при подборе сред, а также осуществляется контроль количества таких соединений.

3. Для оптимизации процесса биосинтеза пенициллина в питательную среду добавляют аминокислоты. Как это может отразиться на количественном выходе целевого продукта, если добавить лизин в значительных концентрациях?

Ответ: Некоторые первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути. Одно «ответвление» или один конец этого пути заканчивается первичным метаболитом, другое «ответвление» - антибиотиком. Так, альфа-аминоадипиновая является, с одной стороны, прямым предшественником лизина, с другой – бета-лактамового антибиотика, так как включается в исходный для его синтеза трипептид. При избытке лизина происходит подавление образования альфа-аминоадипиновой кислоты по принципу обратной связи и, таким образом, снижается синтез не только лизина, но и бета-лактамового антибиотика.

4. В процессе биосинтеза антибиотиков большое значение имеет содержание углерода, азота и фосфора в питательной среде. Как влияет изменение содержания этих веществ на процесс биосинтеза вторичных метаболитов, и на процесс ферментации в целом?

Ответ: Углеродкатаболическая регуляция является одним из механизмов, воздействующих на биосинтез вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза - лучший источник углерода и энергии для любых организмов. Однако быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Показано, что глюкоза ослабляет биосинтез бета-лактамов, аминогликозидов и др. антибиотиков, образуемых разными продуцентами. Относительно биосинтеза антибиотиков отметим, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза - сильные репрессоры этого процесса. Необходимо подчеркнуть, что продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а сам синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Не является репрессором биосинтеза и лактоза, которая также медленно утилизируется: при ее гидролизе освобождающаяся глюкоза репрессирует бета-галактозидазу и, в результате, гидролиз лактозы (появление в среде глюкозы) замедляется.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно для биосинтеза большинства антибиотиков. Общая причина этого - обогащение клетки макроэргическими фосфорными соединениями (прежде всего АТФ), что повышает скорость роста мицелия. Накапливается много биомассы, но относительно мало антибиотика. Например, высокоактивные штаммы продуцентов тетрациклиновых антибиотиков содержат в мицелии меньше АТФ и растут медленнее, чем исходные низкоактивные продуценты тетрациклинов. Неблагоприятное действие фосфора на биосинтез бета-лактамовых антибиотиков объясняется на биохимическом уровне следующим механизмом: образование LLD-трипептида – ключевого соединения, с которого начинается синтез пенициллинов и цефалоспоринов, ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Взаимодействие легкоусвояемого сахара и фосфата оказывает отрицательный эффект на биосинтез. Но фосфор не может быть

полностью исключен из среды. Биосинтез антибиотиков снижается при его избыточном количестве, поэтому нужно подбирать оптимальное содержания.

Аммоний и другие легкоутилизируемые источники азота подобно легкоокисляемым углеводам усиливают рост продуцентов бета-лактамов, полиеновых антибиотиков (эритромицина, рифамицинов и др.), но отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, БВК (белково-витаминный концентрат) медленно расщепляются в процессе ферментации, т.е. из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов питательных сред, что позволяет получать высокий выход антибиотиков. У продуцентов бета-лактамов механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков связан с уровнем глутаминсинтетазы в мицелии. Известно, что глутамин является донором аминогрупп для ряда аминокислот, а сами аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками бета-лактамовых антибиотиков. Вероятно, что у разных продуцентов механизм этого действия на биосинтез различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез обязательно учитывается при подборе сред, а также осуществляется контроль количества таких соединений.

5. В биотехнологическом производстве лекарственных средств большое значение имеет питательная среда. Предложите оптимальную питательную среду в биосинтезе антибиотиков.

Ответ: Интенсивному биосинтезу антибиотика способствует значительное уменьшение в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Происходит дерепрессия ферментов синтеза антибиотика. Однако выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, так как незначительное накопление биомассы ведет, в конечном счете, и к незначительному накоплению антибиотика малым количеством клеток продуцента. Поэтому вместо легко усваиваемых источников углерода используют медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) и лактозу, которые оказывают незначительное влияние на интенсивность биосинтеза.

6. В настоящее время к бета-лактамам антибиотикам имеется очень высокий уровень резистентности. Как объяснить данную ситуацию и можно ли предложить способы преодоления этого негативного явления, опираясь на скрининг ЛС?

Ответ: Способность к индукции бета-лактамаз является отрицательным свойством бета-лактамовых антибиотиков, что объясняет высокий уровень резистентности, поэтому новые бета-лактамовые структуры оцениваются при изучении их свойств не только на устойчивость к ферментативной инактивации, но и на способность индуцировать бета-лактамазы. Последняя зависит от того, с какой мишенью, связывается бета-лактамовый антибиотик, т.к. именно они являются «сенсорами», запускающими сложный механизм индукции бета-лактамаз. Схематически этот процесс выглядит следующим образом: бета-лактамовый антибиотик, находящийся в среде, реагирует с одним из белков, принадлежащих к мишени. Его взаимодействие с белком ведет к изменению конформации этого белка. Меняются биофизические параметры белка, сигнал об этом передается на специальный трансмембранный белок, молекула которого пересекает цитоплазматическую мембрану и выходит на ее внешнюю поверхность. Далее сигнал последовательно передается на первый и второй цитоплазматические белки, включенные в систему индукции ферментов и, наконец, на белок-репрессор, уже непосредственно регулирующий экспрессию именно гена бета-лактамазы. В результате репрессор перестает подавлять экспрессию этого гена. Соответственно, начинаются его экспрессия и синтез молекул информационной РНК, которая далее поступает в рибосомную систему, где на ней как на матрице синтезируются молекулы бета-лактамаз. Ввиду несомненного сходства многих бета-лактамаз с их ферментами-мишенями был предпринят поиск специфических ингибиторов бета-лактамаз. Среди природных бета-лактамовых и продуктов их химической трансформации были отобраны ингибиторы бета-лактамаз, воздействующие и на бета-лактамазы, и на транспептидазы пептидогликана, т.е. обладающие антибактериальной активностью.

Практическая ценность ингибиторов бета-лактамаз обусловлена тем, что их используют вместе с бета-лактамовыми антибиотиками, которые чувствительны к бета-лактамазам. Ингибиторы бета-лактамаз защищают эти антибиотики от ферментативной инактивации. Широкую известность получили такие ингибиторы, как клавулановая кислота и сульбактам и некоторые другие. Однако необходимо учитывать, что любой конкретный ингибитор не может воздействовать на все многочисленные типы бета-лактамаз. Спектр действия каждого ингибитора ограничен бета-лактамазами лишь нескольких типов, распространенных среди бактерий. Выпускается смесь полусинтетического пенициллина (ампициллина) с сульбактамом под названием «уназин». Получил практическое применение и препарат «аугментин», являющийся смесью амоксициллина (полусинтетического пенициллина) с клавулановой кислотой и др.

7. В настоящее время к тетрациклину имеется очень высокий уровень резистентности. Как Вы можете объяснить данную ситуацию и можно ли предложить способы преодоления этого негативного явления?

Ответ: Резистентность микроорганизмов к антибиотикам тетрациклиновой группы: тетрациклину, окситетрациклину, хлортетрациклину получила широкое распространение в связи с их многолетним использованием в медицине, а также в животноводстве в качестве рост-стимулирующих добавок к кормам сельскохозяйственных животных.

Изучение механизмов резистентности бактерий к тетрациклинам привело к результатам, резко отличающимся от тех, что были выявлены в случае бета-лактамов. Так, ферментативной инактивации тетрациклинов рези-

стентными к ним микроорганизмами обнаружено не было. В редких случаях резистентность была связана с защитой или «экранированием» от тетрациклинов (ингибиторов белкового синтеза) рибосом. У резистентных штаммов был найден белок, предотвращающий доступ тетрациклинов к местам их связывания на рибосоме. Наиболее часто встречающийся механизм тетрациклинорезистентности обусловлен изменениями, происходящими в оболочке, точнее в цитоплазматической мембране бактериальной клетки. Известно, что в клетках резистентных штаммов тетрациклины не накапливаются. При этом в цитоплазматической мембране присутствуют несколько новых белков, которые отсутствуют в мембране тетрациклиночувствительных штаммов. Эти новые белки, появляющиеся в цитоплазматической мембране при тетрациклинорезистентности, являются белками, составляющими систему активного «выброса» тетрациклинов, проникающих в клетку. Иными словами, тетрациклины проходят через оболочку бактериальной клетки, в том числе и через цитоплазматическую мембрану, однако они не успевают прореагировать с рибосомами, так как быстро удаляются или «выбрасываются» в среду. В настоящее время в медицинскую практику внедрено несколько продуктов химической трансформации природных тетрациклинов. Наиболее важным из них является доксициклин (6-дезоксидокси-5-окситетрациклин), который гораздо дольше циркулирует в организме, чем природные тетрациклины.

8. Биотехнологическое производство ЛС основано на использовании биообъектов, функции которых на разных этапах процессов биосинтеза различны. Рассмотрите варианты их использования.

Ответ: Биообъекты характеризуются такими показателями, как уровень структурной организации, способность к размножению (или репродукции), наличие или отсутствие собственного метаболизма при культивировании в подходящих условиях. Что касается характера биообъектов, то под этим следует понимать их структурную организацию. В таком случае биообъекты могут быть представлены молекулами (ферменты, иммуномодуляторы, нуклеозиды, олиго- и полипептиды, и т. д.), организованными частицами (вирусы, фаги, виоиды), одноклеточными (бактерии, дрожжи) и многоклеточными особями (нитчатые высшие грибы, растительные каллусы, однослойные культуры клеток млекопитающих), целыми организмами растений и животных.

Молекулярные биообъекты накладывают свой отпечаток на организацию и аппаратное оформление соответствующих биотехнологических процессов. Вирусы и фаги как облигатные паразиты могут культивироваться только на живых клетках и тканях, то есть фактически биотехнологические процессы здесь основываются на использовании клеток, зараженных вирусами или несущих вирус (-ы). Одноклеточные виды прокариот и эукариот могут использоваться в биотехнологических процессах в виде монокультур или в ассоциациях. Для сравнения можно назвать производство какого-либо антибиотика (пенициллина, рифамицина и др.) с помощью чистой культуры соответствующего продуцента, а также производство кефира с помощью кефирных "зерен" ("грибков"), в состав которых входят лактобактерии и дрожжи. Следовательно, в последнем случае применяют природную ассоциацию микроорганизмов, и кефир является продуктом смешанного брожения - молочнокисло-го и спиртового.

9. Суперпродуцент – это биообъект промышленного использования. Как можно получить его и какими свойствами он должен обладать в отличие от природного штамма культуры?

Ответ: Суперпродуцент — микробный штамм, нацеленный на синтез определенного продукта в высокой концентрации. Суперпродуценты можно получить, применяя методы мутагенеза, клеточной и генной инженерии. Отличительные особенности суперпродуцентов от природных штаммов: максимальный выход целевого продукта, стабильность, экономичность, отсутствие патогенности, отсутствие даже «следов» микробных токсинов, образовавшийся суперпродуцентами целевой продукт не должен расщепляться протеазами клетки, желательно, чтобы у суперпродуцента целевого продукта последний выводился из клетки в питательную среду, что значительно облегчит его последующее выделение и очистку.

10. Проведите сравнительную характеристику каллусных и суспензионных культур при использовании их в качестве субстрата для получения БАВ биотехнологическими методами.

Ответ: Использование новых технологий получения биомассы лекарственных растений в виде каллусных и суспензионных культур имеет ряд общих преимуществ:

- стандартность накапливаемого сырья;
- высокий выход активного начала;
- сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы;
- возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, унгерея и др.;
- использование разных технологических режимов;
- использование методов иммобилизации и биотрансформации для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применительно к растительным клеткам.

Общие особенности культур растительных клеток, затрудняющие работу с их культурами:

- размеры клеток растений (15-1000 мкм) в 50-100 раз больше, чем клеток бактерий;
- в результате роста клеток растений у них появляется большая вакуоль, при этом все физические и химические константы клеток изменяются;
- культуры клеток растений имеют целлюлозную стенку.

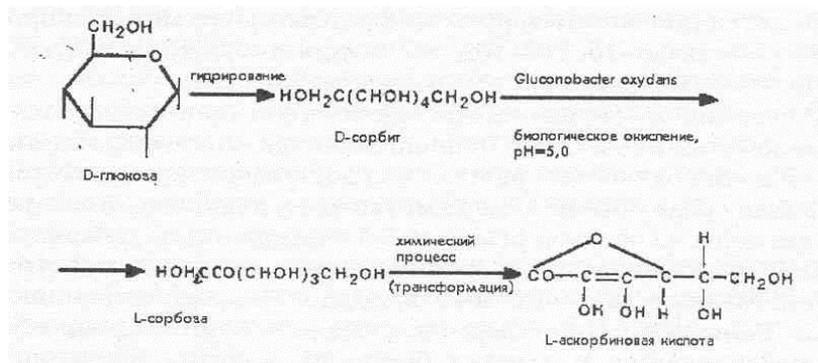
Использование технологии получения каллусных культур из растительного сырья дает такие преимущества, как надежность и стабильность по выходу биомассы и продуктов вторичного метаболизма, а также возможность использования каллусной системы для иммобилизации с последующей биотрансформацией. Недостаток каллусного культивирования – применение ручного труда.

Из сравнения каллусных и суспензионных культур следует, что выход продуктов вторичного метаболизма выше именно в каллусных культурах, но при этом управление процессом культивирования легче осуществлять при работе с суспензионными культурами. Имеются выгодные отличия при применении иммобилизованных каллусных клеток от суспензионных культур: многократное использование, четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма, увеличение продолжительности культивирования на стадии активного биосинтеза, получение большего количества вторичных метаболитов, сокращение времени ферментации, увеличение срока работы клеток. Следует отметить, что синтез метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до получения необходимого целевого продукта. В этом случае получение конечного продукта возможно, лишь благодаря процессу биотрансформации, суть которого состоит в изменении промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или клеток бактерий с целью повышения биологической активности конкретной химической структуры.

Большинство каллусных тканей растут в условиях слабого освещения, т.к. они не способны к фотосинтезу. Для большинства каллусных растений важна оптимальная температура (26°C). Из-за низкой интенсивности дыхания этих клеток потребность в кислороде соответственно понижена, и необходимость в обеспечении данных культур системной интенсивной аэрации отпадает. Оптимальная влажность для роста культуры обычно составляет 60-70%. Важен подбор ингредиентов среды культивирования: используют жидкие многокомпонентные среды, содержащие макроэлементы, микроэлементы, источники железа, витамины, фитогормоны, ауксины, цитокинины, источники углерод.

11. Получение субстанции аскорбиновой кислоты является многостадийным процессом, в котором сочетаются методы органического и микробиологического синтеза. Какой предшественник аскорбиновой кислоты получают с использованием биотехнологии и каково значение этого этапа для всего процесса в целом?

Ответ: Аскорбиновая кислота, или витамин С - это витамин, имеющийся у всех высших растений и животных; только человек и микробы не синтезируют ее, но людям она необходима, а микробы не нуждаются в ней. И, тем не менее, определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта этой кислоты - L-сорбозы. Таким образом, весь процесс получения аскорбиновой кислоты является смешанным, то есть химико-ферментативным.



Биологическая стадия процесса катализируется мембраносвязанной полиолдегидрогеназой, а последняя (химическая) включает последовательно следующие этапы: конденсация сорбозы с диацетоном и получение диацетон - L-сорбозы, окисление диацетон --L-сорбозы до диацетон-2-кето-гулоновой кислоты, подвергаемой затем гидролизу и энolisации с последующей трансформацией в L-аскорбиновую кислоту.

12. Организация любого биотехнологического производства ЛС предполагает подготовительный и основной этапы работы. Какие виды работ необходимо провести в данном случае?

Ответ: В общем виде любой биотехнологический процесс включает три основные стадии: предферментационную, ферментационную и постферментационную. Принципиальная схема реализации биотехнологических процессов в общем виде может быть представлена блок-схемой, в которой сделана попытка охватить все варианты ферментационных процессов. На предферментационной стадии осуществляют хранение и подготовку культуры продуцента (инокулята), получение и подготовку питательных субстратов и сред, ферментационной аппаратуры, технологической и рециркулируемой воды и воздуха. В отделении чистой культуры осуществляют хранение производственных штаммов и обеспечивают их реактивацию и наработку инокулята в количествах, требуемых для начала процесса. При выращивании посевных доз инокулята применяют принцип масштабирования, то есть проводят последовательное наращивание биомассы продуцента в колбах, бутылках, далее в серии последовательных ферментеров. Каждый последующий этап данного процесса отличается по объему от предыдущего обычно на порядок. Полученный инокулят по стерильной посевной линии направляется далее в аппарат, в котором реализуется ферментационная стадия. Приготовление питательных сред осуществляется в специаль-

ных реакторах, оборудованных мешалками. Дозирование питательных компонентов подбирается и осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с Технологическим регламентом конкретного процесса. Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов). Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе (ферментере). Постферментационная стадия обеспечивает получение готовой товарной продукции и также, что не менее важно, обезвреживание отходов и побочных продуктов. В зависимости от локализации конечного продукта (клетка или культуральная жидкость) и его природы на постферментационной стадии применяют различную аппаратуру и методы выделения и очистки. Наиболее трудоемко выделение продукта, накапливающегося в клетках. Первым этапом постферментационной стадии является фракционирование культуральной жидкости и отделение взвешенной фазы – биомассы. Наиболее распространенный для этих целей метод – сепарация, осуществляемая в специальных аппаратах – сепараторах, которые работают по различным схемам в зависимости от свойств обрабатываемой культуральной жидкости. Для увеличения сроков годности биотехнологических продуктов производят их обезвоживание и стабилизацию.

13. При получении генно-инженерного инсулина какие микроорганизмы используются в качестве продуцентов?

Ответ: Генно-инженерный инсулин был впервые синтезирован с помощью *E. coli*, синтезированы обе цепи человеческого инсулина, которые затем были соединены в молекулу биологически активного гормона. Чтобы одноклеточный организм смог синтезировать на своих рибосомах молекулы инсулина, его снабдили нужной программой, т.е. ввели ему ген гормона. Ген, программирующий биосинтез предшественника инсулина или два гена, программирующие в отдельности биосинтез цепей А и В инсулина получили химическим способом. Следующий этап - включили ген предшественника инсулина (или гены цепей инсулина порознь) в геном *E. coli*. Из *E. coli* вычленили плазмиду соответствующей рестриктазой. Синтетический ген встроили в плазмиду (клонированием с функционально активной С-концевой частью β-галактозидазы *E. coli*). В результате *E. coli* приобрела способность синтезировать белковую цепь, состоящую из β-галактозидазы и инсулина. Синтезированные полипептиды отделили от фермента химическим путём, затем провели их очистку. В настоящее время в массовом производстве человеческого инсулина использует технологию рекомбинантных ДНК, помещая к ДНК гена человеческого проинсулина в *E. coli* или *S. segetis* и гидролизую наработанный проинсулин до молекулы инсулина.

14. Проанализируйте возможность успешного сочетания биосинтеза, оргсинтеза и биотрансформации на примере получения бета-лактамовых антибиотиков.

Ответ: Биосинтез антибиотика осуществляется микроорганизмами на определённом этапе их развития. Эта закономерность характерна для бактерий, мицелиальных грибов (*Penicillium chrysogenum* и др.). Максимально высокую активность штамма-продуцента способна обеспечить технология рекомбинантных ДНК, так как можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. С накоплением определенной концентрации антибиотика рост микроорганизмов прекращается. Это стадия биосинтеза. Из культуральной жидкости антибиотик, где он находится в виде кислоты, выделяют путём экстракции неполярными органическими растворителями (амилацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом и др.). Очистку антибиотика проводят путём замены растворителей, поскольку соли пенициллина плохо растворимы в органических растворителях. Экстрагированный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щёлочь. Повторяя эти операции, пенициллин концентрируют и очищают. Это стадия органической обработки пенициллина. В настоящее время большое практическое значение имеет полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина. Исходным продуктом служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК). Используется иммобилизованная пенициллинацилаза, которая гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты. Сама по себе 6-АПК не активна. Её подвергают химическому ацилированию и получают аналоги пенициллина с улучшенными или новыми свойствами; некоторые из них: оксациллин, ампициллин, метициллин, амоксициллин и другие. Стадия биотрансформации.

15. При производстве пенициллина в начале ферментации было добавлено в питательную среду определенное количество фенилуксусной кислоты, что привело к снижению выхода целевого продукта. Какая ошибка была допущена в данном процессе?

Ответ: Синтез того или иного пенициллина зависит от наличия специфического вещества в среде, иначе говоря, предшественника, который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления. Следует отметить, что предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определённых - концентрациях и рН среды оказывают токсическое влияние на продуцента. Фенилуксусная кислота наименее токсична. Добавление её в среду в концентрации выше 500 мг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 ч его развития. Фенилуксусная кислота добавляется в концентрации от 100 до 500 мг/мл через 24 ч развития *P. chrysogenum*.

16. Известно, что требования экологии часто не совпадают с технологическим регламентом фармацевтического производства в целом и биотехнологического в частности. Какие виды очистки и для какого рода отходов предусматривают использование «активного ила» и «штаммов-деструкторов»?

Ответ: Каждое биопроизводство должно обеспечить защиту:

- сырья, промежуточных и конечных продуктов от любого загрязнения;
- персонала от субстанций, с которыми они работают;
- окружающей среды от веществ, которые при отсутствии соответствующих мер и контроля могут потоком воздуха выйти наружу с биопредприятия.

При неосторожной работе с рекомбинантными штаммами не исключено их попадание в окружающую среду, где они могут вызвать неконтролируемые мутации не только у микроорганизмов, но и у других видов живых существ. Это требует от персонала, занятого в разработке и реализации биотехнологических процессов с использованием приемов геной инженерии, большей ответственности и производственной дисциплины.

Перед окончательным удалением из установки все рекомбинантные микроорганизмы должны быть инактивированы в соответствии с определенными инструкциями. Отработанную культуральную среду тщательно проверяют на наличие в ней жизнеспособных микроорганизмов, чтобы исключить их попадание в окружающую среду. Серьезные экологические проблемы возникают в связи с защитой водоемов от сточных вод, образующихся в больших объемах при биотехнологическом процессе. Основа очистки сточных вод и защиты от них водоемов – дорогостоящие специальные очистные сооружения, а также замкнутые системы водооборота. Перед спуском сточных вод в очистные сооружения отработанные нативные растворы подвергают предварительно УФ-облучению с одновременным введением окислителя, что позволяет разрушить высокомолекулярные органические соединения с образованием низкомолекулярных веществ, поддающихся биологическому окислению в системе очистных сооружений. В «часы пик» предпочтительно эпизодическое использование коммерческих препаратов – генно-инженерных штаммов-деструкторов, например бактерий рода *Pseudomonas*, клетки которых содержат оксидоредуктазы и гидроксилазы, способные разлагать большое число молекул углеводов и ароматических соединений, таких как бензол, ксилит, толуол. Преимущество бактериальной очистки по сравнению с химической в том, что она не вызывает появления нового загрязняющего агента в окружающей среде.

В основе биологической очистки воды лежит деятельность активного ила (АИ) или биопленки, естественно возникшего биоценоза, формирующегося на каждом конкретном производстве в зависимости от состава сточных вод и выбранного режима очистки. Активный ил представляет собой темно-коричневые хлопья, размером до нескольких сотен микрометров. На 70% он состоит из живых организмов и на 30% - из твердых частиц неорганической природы. Живые организмы вместе с твердым носителем образуют зооглей - симбиоз популяций микроорганизмов, покрытый общей слизистой оболочкой. Микроорганизмы, выделенные из активного ила относятся к различным родам: *Actinomyces*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Desulfomonas*, *Pseudomonas*, *Sarcina* и др. Наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas*, о которых упоминалось ранее.

17. В условиях биотехнологического производства какие витамины группы В могут быть получены с использованием микробиологического синтеза?

Ответ: Витамин В12 - цианкобаламин – являющийся гематопозитическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов. Микробиологический синтез является единственным способом получения данного витамина. Способность к синтезу данного витамина широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцирует витамин *Pseudomonas*. Витамин В2 (рибофлавин): микроорганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы – ФАД и ФМН. Продуцентами витамина являются бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), микроскопические (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) и плесневые грибы (*Aspergillus niger*). Промышленное получение рибофлавина осуществляется химическим синтезом, микробиологическим и комбинированным: при этом синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В2. Витамин В5 (пантотеновая кислота): биосинтез пантотеновой кислоты осуществляется из пантоевой кислоты. Большинство микроорганизмов являются пантотенатпрототрофными, т.е. осуществляют биосинтез пантотеновой кислоты. Её катаболизм у микроорганизмов начинается с гидролиза витамина до D-пантоевой кислоты и β-аланина; D-пантоевая кислота в последовательных реакциях превращается в 2-оксоизовалериановую кислоту.

18. Совершенствование биообъектов как источников ЛС включает несколько направлений. Определите эти направления в соответствии с целевыми задачами.

Ответ: Биотехнология заинтересована в совершенствовании биообъекта независимо от того, на какой ступени «лестницы живых существ» находится этот биообъект. Если организм, выделенный из природной среды, не будет подвергнут совершенствованию, то производственный процесс образования целевого продукта или экономически нецелесообразен, или технически трудноосуществим. *Клеточная инженерия* – это один из основных разделов современной биотехнологии, основанный на выделении и культивировании тканей и клеток высших многоклеточных организмов. Культивирование тканей и клеток происходит вне организма – *in vitro* («в пробирке, в колбе, в стеклянной посуде»), в специально подобранных условиях. Использование культур клеток позволяет преодолеть многие проблемы биоэтики (биологической этики), связанные с умерщвлением животных. Кроме того, в культуре можно выращивать строго определенные клетки в неограниченном количестве. На

культурах клеток получают вакцины, например, против кори, полиомиелита. Сохраняя культуры клеток, можно сохранять генотипы отдельных организмов и создавать банки генофондов целых видов. Например, при получении моноклональных антител используются клеточные гибриды между лимфоцитами иммунизированных животных и интенсивно размножающимися клетками миеломы. Полученные первичные дикарионы образуют истинные гибридные клетки, которые интенсивно размножаются за счет генома опухолевых миеломных клеток и одновременно выделяют большое количество антител, за счет работы генома иммунизированных лимфоцитов. Этот прием позволяет получать большое число гибридных клеток, вырабатывающих большие количества необходимых антител.

Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека. Например, получение «биологических реакторов» - микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определёнными ценными для человека признаками. Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

19. При промышленном получении рекомбинантных белков выбор микроорганизма-продуцента зависит от многих факторов. Определите критерии отбора микроорганизма.

Ответ: Успехи генетической инженерии привели к тому, что свыше 100 белков человека (биорегуляторов, корректоров гомеостаза, факторов врожденного приобретенного иммунитета) могут сохранять свою видоспецифичность. Они нарабатываются как лекарственные средства путем микробиологического синтеза. При этом технология рекомбинантной ДНК позволяет их совершенствовать: повышать физиологическую активность, снижать вероятность побочных реакций после введения и т.п. При выборе микроорганизмов (как продуцента чужеродных белка предполагаемого лекарственного препарата) необходимо наиболее полно изучить геном, подробно исследовать метаболизм на уровне вида, чтобы микроорганизм обладал умеренной патогенностью (в идеале предполагается ее полное отсутствие), чтобы микроорганизм был способен расти в условиях производства на недефицитных и экономически доступных средах. Избранные в качестве предполагаемых продуцентов микроорганизмы оцениваются и изучаются уже на уровне конкретных штаммов. При необходимости штаммы-биообъекты (как носители чужеродного генетического материала и продуценты чужеродного белка) могут быть усовершенствованы методами генетической инженерии, что позволяет свести к минимуму вероятность протеолиза чужеродных белков, гидролиза чужеродной информационной РНК и «исключения» чужеродных генов из генома.

20. При совершенствовании биотехнологического производства активно используется иммобилизация биообъекта. Какие технологические проблемы производства ЛС решает инженерная энзимология?

Ответ: Основная задача инженерной энзимологии – разработка биотехнологических процессов, в которых используется каталитическое действие ферментов, выделенных из состава биологических систем или находящихся внутри клеток, искусственно лишенных способности расти. В основе современной энзимологии лежит применение иммобилизованных ферментов и ферментных систем. Иммобилизация – это процесс прикрепления ферментов к поверхности природных или синтетических материалов, включение их в полимерные материалы, полые волокна и мембранные капсулы, поперечная химическая сшивка. В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов – их можно удалять из реакционной смеси (и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией. Этим устраняется первый из перечисленных недостатков растворимых ферментов как технологических катализаторов. Появляется также возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим. Иммобилизованные ферменты более устойчивы к внешним воздействиям, т.о. возникла возможность преодоления второго недостатка растворимых ферментов – их лабильности.

Высокая субстратная специфичность ферментативного катализа и уникальная способность ускорять реакции в десятки и сотни раз в условиях нормального давления и физиологических температур позволяют получать высокие выходы продуктов и создавать практически безотходные биотехнологические процессы, не загрязняющие окружающую среду.

21. На основании классификации биосинтеза по материальным потокам проведите сравнительную характеристику режимов ферментации в зависимости от целевого продукта биотехнологического производства.

Ответ: Периодическая культура с добавлением субстрата предполагает периодическое внесение в ферментер увеличивающегося количества питательных веществ. При этом культуральную среду не удаляют до окончания процесса. Периодическое добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз, к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы. Для обеспечения непрерывного синтеза рекомбинантного белка и его стабильности необходим тщательный контроль процесса и добавление субстрата (источника углерода, азота, витаминов, микроэлементов и др. БАВ) тотчас, как в этом возникает необходимость.

В зависимости от генотипа микроорганизма и природы рекомбинантного белка периодическая ферментация с

добавлением субстрата может повысить выход готового продукта на 25-1000% по сравнению с простой периодической ферментацией.

Периодическая ферментация с добавлением субстрата используется также для культивирования клеток млекопитающих и насекомых; эти культуры широко применяют для получения белковых продуктов, имеющих медицинское значение, кроме того, без периодического добавления субстрата, клетки млекопитающих неэффективно синтезируют чужеродные белки. Для периодической ферментации характерны небольшие различия во времени сбора клеток, который проводят, начиная с середины экспоненциальной фазы, и заканчивают ее поздним этапом.

При непрерывной ферментации свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии. Таким образом, убыль числа клеток (удаление продукта) уравновешивается их увеличением в результате деления. При этом жестко контролируют скорость притока культуральной среды и постоянный объем культуры в биореакторе.

Преимущества непрерывной ферментации:

- при непрерывной ферментации нужны не столь громоздкие биореакторы и оборудование для сбора клеток, их разрушения, последующей очистки белкового продукта или метаболита, синтезированного микроорганизмами;
- биореактор периодического действия время от времени разгружают, готовят к повторному использованию (ремонт, чистка, стерилизация биореактора – основная причина снижения эффективности процесса); для ферментера, работающего в непрерывном режиме, простой существенно меньше;
- при непрерывной ферментации синтез целевого продукта происходит более согласованно, так как физиологический статус большинства клеток одинаков.

Непрерывную ферментацию используют для промышленного получения белков одноклеточных микроорганизмов и антибиотиков, однако, этот способ выращивания микроорганизмов связан с определенными затруднениями:

- продолжительность ферментации в непрерывном режиме составляет иногда 500-1000 ч, в течение которого некоторые клетки могут потерять рекомбинантные плазмиды;
- в промышленных установках затруднительно в течение длительного времени поддерживать стерильные условия; непрерывные процессы требуют наличия стерильного резервного оборудования, что значительно увеличивает основные затраты.

22. Зная молекулярные механизмы внутриклеточной регуляции в микробной клетке, можно управлять процессами биосинтеза. Каково влияние ретроингибирования на выход целевого продукта – аминокислоты лизина?

Ответ. Ретроингибирование - подавление конечным продуктом активности первого фермента метаболического процесса. Например, как только концентрация конечного метаболита становится достаточной для удовлетворения нужд клетки, метаболит начинает отрицательно влиять на свой собственный биосинтез. В результате подавляется активность первого фермента, что влечет прекращение образования не только метаболита, но и всех его промежуточных предшественников. Т.е. если клетке в данный момент конечный метаболит не нужен, то не нужны и его предшественники. Поскольку конечный метаболит уже прекратил свое образование, но продолжает расходоваться, естественно, что концентрация его в клетке понижается. Как только она достигает соответствующего нижнего предела, синтез метаболита быстро начинается вновь из-за того, что метаболит как ингибитор своего биосинтеза взаимодействует (за счет водородных связей) с аллостерическим центром начального фермента метаболической цепочки. Поэтому фермент сохраняет потенциальную способность вновь быстро перейти в активное состояние, что и происходит после освобождения аллостерического центра от ингибитора, вследствие понижения его концентрации.

Биотехнолог может преодолеть механизм ретроингибирования и заставить клетку непрерывно нарабатывать метаболит. Во-первых, можно непрерывно удалять образующийся метаболит из питательной среды и таким образом снижать его внутриклеточную концентрацию. Это достигается внесением в среду сорбента: в результате концентрация растворенного метаболита (целевого продукта) снижается, и механизм ретроингибирования не включается. Во-вторых, можно использовать ген, но инженерные методы - сконструировать продуцент с мутацией аллостерического центра начального фермента метаболической цепочки. При этом изменения в конформации аллостерического центра должны не меняться под действием ингибитора. В этом случае ретроингибирование уже не будет ограничивать синтез данного метаболита. В-третьих, необходим специальный контроль за составом сред, используемых при ферментации. В них должно быть ограничено количество метаболита (целевого продукта), но предотвратит возможность его отрицательного влияния на собственный биосинтез в клетках продуцента. Весьма иллюстративен пример неудачи при биосинтезе пенициллина (продуцент *Penicillium chrysogenum*) на комплексной, богатой лизином среде, используемой в качестве добавки к некоторым дешевым и недефицитным комплексным средам. Лизин является первичным метаболитом, пенициллин - вторичным. Одним из предшественников лизина является аминокислота, входящая в состав так называемого LLD-трипептида, из которого в результате ряда последующих реакций формируется молекула пенициллина. Поэтому лизин, подавляя собственный биосинтез по механизму ретроингибирования, одновременно подавляет и биосинтез аминокислоты, а, следовательно, и пенициллина. Таким образом, для биотехнологов, работающих в антибиотической промышленности, возникает актуальная задача по подбору сред с ограниченным

количеством лизина или создания производственных штаммов *Penicillium chrysogenum* с нарушенным механизмом ретроингибирования по лизину.

23. При получении БАВ рост каллусной ткани в процессе ферментации осуществляется в несколько этапов. В какой фазе необходимо стимулировать активность клеток?

Ответ. Каллусная ткань - один из видов клеточной дифференцировки, возникает путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток органов растения. Одним из важнейших гормонов, применяемых в начальных фазах культивирования каллуса *in vitro* является ауксин, который активирует деление и растяжение клеток. Предполагается, что поступление ауксина в клетку способствует усилению секреции кислых гидролаз и полисахаридов, необходимых для дальнейшего роста клеточных стенок. Все это приводит к значительному ускорению темпов размножения клеток. В цикле выращивания каллусной ткани клетки после ряда делений приступают к росту растяжением, дифференцируются как зрелая каллусная ткань и деградируют. Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную среду через 28 - 30 дней, то есть проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани.

24. Производство ферментов имеет определенную специфику их получения с помощью биотехнологии. Определите эту специфику в соответствии со свойствами самих ферментов.

Ответ. При биотехнологическом производстве ферментов (Ф) следует учитывать, что синтез многих Ф репрессирован легкоусвояемыми источниками углерода (глюкозой, фруктозой, маннозой и др.); этот эффект носит название катаболитной репрессии (иногда глюкозным эффектом). Катаболитной репрессии подвержен биосинтез таких Ф, как α -амилаза, целлюлаза, глюкоамилаза, инвертаза, трансэлиминаза полигалактуроновой кислоты.

Ферменты, катализирующие превращение азотсодержащих субстратов, также регулируются по механизму катаболитной репрессии; их биосинтез репрессирован ионами аммония или быстроусвояемыми аминокислотами. Аминокислоты в анаэробных условиях культивирования инициируют биосинтез соответствующих декарбоксилаз. При наличии в среде большой концентрации мочевины стимулируется биосинтез уреазы. Введение в среду культивирования аргинина индуцирует биосинтез аргиназы. Источниками органического азота могут служить пептон, триптон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина или любая их смесь.

Наличие в среде культивирования различных биополимеров обуславливает одновременное накопление комплекса протеаз, амилаз, нуклеаз, липаз.

На рост микроорганизмов и биосинтез Ф существенное влияние оказывают ионы кальция, марганца, цинка и др. Ионы железа и магния активируют и стабилизируют протеолитические ферменты. Присутствие ионов железа и меди в среде культивирования существенно для биосинтеза железо- и медьсодержащих Ф, участвующих, как правило, в окислительно-восстановительных реакциях (утилизации и превращения энергии). Отсутствие таких ионов может негативно отразиться на скорости многих метаболических процессов и, на биосинтезе Ф, катализирующих эти процессы.

25. При внедрении технологии суспензионного культивирования: Какие основные свойства растительных клеток необходимо учитывать? Как это связано с выбором режима ферментации и особым устройством ферментера?

Ответ. Растительные клетки и ткани имеют свои особенности, затрудняющие работу с их культурами: 1) размеры клеток растений (15-1000 мкм) в 50-100 раз больше, чем клеток бактерий; 2) в результате роста клеток растений у них появляется большая вакуоль, при этом все физические и химические константы клеток изменяются; 3) суспензионные культуры состоят из клеток-агрегатов разного размера; 4) культуры клеток растений имеют целлюлозную стенку, что также весьма затрудняет работу. При промышленном выращивании суспензионных культур применяют биореакторы, в которых процессы глубинного культивирования ведут к увеличению биомассы и синтезу вторичных соединений. Выделяют биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается только за счет подачи воздуха, и биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается механическим путем. Культуры растительных клеток выращивают в одном из двух режимов: 1) первый – периодическое культивирование, при котором по окончании процесса биосинтеза откачивают и используют всю суспензию клеток; 2) полупериодическое культивирование, при котором в биореактор постоянно добавляют определенный объем свежей питательной среды и одновременно забирают тот же объем либо клеточной суспензии, либо отработанный питательной среды, оставляя при этом клеточную массу в реакторе. В основном растительные клетки выращивают в периодическом режиме.

Из-за низкой интенсивности дыхания растительных клеток потребность в кислороде соответственно понижена, и необходимость в обеспечении данных культур системной интенсивной аэрации отпадает. В связи с этим при внедрении технологии суспензионного культивирования надо подбирать соответствующие типы биореакторов с объемом не более 20 м³ и с системами особого перемешивания (восходящий поток воздуха, встряхивание), чтобы не разрушить растительные клетки. При сравнении ферментеров разных типов установлено, что максимальный синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре происходит при подаче воздуха снизу. Оптимальная влажность для роста культуры обычно составляет 60-70%. Важен подбор ингредиентов среды культивирования: используют жидкие многокомпонентные среды, содержащие макроэлементы, микроэлементы,

источники железа, витамины, фитогормоны, ауксины, цитокинины, источники углерод.

26. Какие этапы работы в биотехнологическом производстве ЛС предполагает подготовительная стадия?

Ответ. На предферментационной стадии осуществляют хранение и подготовку культуры продуцента (инокулята), получение и подготовку питательных субстратов и сред, ферментационной аппаратуры, технологической и рециркулируемой воды и воздуха. В отделении чистой культуры осуществляют хранение производственных штаммов и обеспечивают их реактивацию и наработку инокулята в количествах, требуемых для начала процесса. При выращивании посевных доз инокулята применяют принцип масштабирования, то есть проводят последовательное наращивание биомассы продуцента в колбах, бутылках, далее в серии последовательных ферментеров. Каждый последующий этап данного процесса отличается по объему от предыдущего обычно на порядок. Полученный инокулят по стерильной посевной линии направляется далее в аппарат, в котором реализуется ферментационная стадия. Приготовление питательных сред осуществляется в специальных реакторах, оборудованных мешалками. Дозирование питательных компонентов подбирается и осуществляется индивидуально на каждом производстве в соответствии с технологическим регламентом конкретного процесса.

27. Известно, что иммунная защита человека может быть усилена определенными иммунобиопрепаратами, такими как вакцины, сыворотки, рекомбинантные интерфероны, интерлейкины. Определите роль генной инженерии в создании этих препаратов.

Ответ. Иммунобиотехнология – это раздел современной биотехнологии, представленной как научными достижениями, так и динамично развивающимся технологическим производством диагностических, профилактических и лекарственных средств с применением в качестве действующего начала разных агентов и процессов иммунной системы.

Существующие традиционные вакцины, несмотря на очевидный положительный эффект их широкого применения, обладают рядом недостатков. К ним относятся: наличие нежелательных биологически активных и балластных компонентов в препаратах, неполноценные иммунологические свойства самих антигенов. Кроме того, существуют заболевания, не вызывающие иммунитета, вакцины против которых вообще отсутствуют и не могут быть сконструированы на основе классических принципов. Все это вызывает необходимость усовершенствования уже существующих вакцин и создания принципиально новых типов вакцин. Одним из наиболее перспективных направлений в данной области является получение вакцинных препаратов на основе методов генной инженерии.

Последним достижением генной инженерии и биотехнологии стало создание рекомбинантных противовирусных вакцин, содержащих гибридные молекулы нуклеиновых кислот. Данные вакцины обладают целым рядом преимуществ. Они характеризуются отсутствием (или значительным снижением) балластных компонентов, полной безвредностью, низкой стоимостью, которая связана с удешевлением промышленного производства вакцин. Экспрессируемый в клетках вакцинированного животного белок имеет конформацию, близкую к нативной, и обладает высокой антигенной активностью.

28. Технология биосинтеза антибиотиков может осуществляться как поверхностной, так и глубокой ферментацией. Приведите сравнительную характеристику этих ферментаций с точки зрения развития промышленного способа производства антибиотиков и аппаратного оформления.

Ответ. Продуценты большинства антибиотиков, в том числе важнейших для медицинской практики, являются аэробами или (реже) факультативными анаэробами. В связи с этим в первые годы после получения пенициллина и др. веществ их продуценты выращивали на поверхности жидкой питательной среды в стационарных условиях в микробиологических матрасах или колбах, помещаемых в термостат или термостатные комнаты. Культура продуцента росла только на поверхности среды. Этот способ был трудоемок, не экономичен и не позволял нарабатывать антибиотик в больших количествах. Очень скоро поверхностная ферментация была заменена на глубинную. Через питательную среду пропускали воздух и среду непрерывно перемешивали. Это позволило использовать для роста продуцента весь объем среды. Только глубинная ферментация создала возможность современного биотехнологического производства с выпуском конечного продукта в большом количестве.

29. В процессе ферментации растительных клеток для увеличения выхода целевого продукта (например, шиконина) было предложено значительно увеличить температуру до 37°C, объем ферментера (более 2000 л), использовать трехлопастную мешалку, увеличить подачу кислорода и повысить влажность среды с 50% до 60-70%. Определите, какие ошибки были допущены при выборе условий ферментации?

Ответ. В процессе ферментации растительных клеток для увеличения выхода целевого продукта необходимо соблюдать определенные условия. Оптимальная температура – около 26°C. Из-за низкой интенсивности дыхания этих клеток потребность их в кислороде соответственно понижена, и необходимость в обеспечении данных культур системой интенсивной аэрации отпадает. В связи с этим при внедрении технологии суспензионного культивирования надо подбирать биореакторы с объемом не более 20 м³ и с системами особого перемешивания (турбинное, восходящий поток воздуха и встряхивание), чтобы не разрушить клетки. Оптимальная влажность для роста культуры – 60-70%

30. Известно, что из растения *Digitalis lanata* можно синтезировать как токсичный дигитоксин, так и менее токсичный дигоксин. Возможно ли преобразование дигитоксина в дигоксин с помощью биотехнологии?

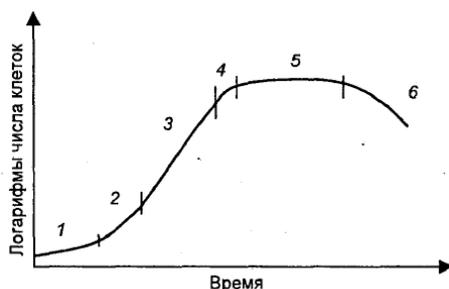
Ответ. Интересна важная особенность: из дифференцированных клеток растения *Digitalis lanata* можно синтезировать как токсичный дигитоксин, так и менее токсичный дигоксин, тогда как недифференцированные культуры клеток *Digitalis lanata* сами по себе не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять реакции биотрансформации дигитоксина в дигоксин.

31. В медицинской практике широко используются для лечения различных инфекций комбинации антибиотика ампициллина с сульбактамом (2:1) под фирменным названием «уназин», а также препарат «сультамициллин», представляющий химическое соединение ампициллина с сульбактамом. Какова необходимость в создании таких соединений?

Ответ. Необходимость создания указанных препаратов основана на уменьшении явления резистентности. Известно, что в ответ на введение бета-лактамовых антибиотиков образуются бета-лактамазы, что и объясняет высокий уровень резистентности. Ввиду несомненного сходства многих бета-лактамаз с их ферментами-мишенями был предпринят поиск специфических ингибиторов бета-лактамаз, которые защищают антибиотики от ферментативной инактивации. Практическая ценность ингибиторов бета-лактамаз обусловлена тем, что их используют вместе с бета-лактамовыми антибиотиками, которые чувствительны к бета-лактамазам. Широкую известность получили такие ингибиторы, как клавулановая кислота и сульбактам и другие. Выпускается смесь полусинтетического пенициллина (ампициллина) с сульбактамом под названием «уназин». Получил практическое применение и препарат «аугментин», являющийся смесью амоксициллина (полусинтетического пенициллина) с клавулановой кислотой и др.

32. Сравните кривые роста микроорганизмов при получении первичных и вторичных метаболитов в биотехнологическом производстве.

Ответ. Различают шесть основных фаз роста: лаг-фаза (1); фаза ускорения (2); экспоненциальная или логарифмическая фаза (3); фаза замедления (4); стационарная фаза (5); фаза отмирания (6).



Как правило, после инокуляции стерильной культуральной среды мгновенного увеличения числа клеток не наблюдается. В течение определенного периода времени, называемого лаг-фазой, клетки адаптируются к новым условиям. Если посевным материалом служит культура, находящаяся в экспоненциальной фазе, выраженная лаг-фаза может отсутствовать и рост клеток начнется немедленно после инокуляции. Между лаг- и экспоненциальными фазами есть короткий период – фаза ускорения, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины. В период экспоненциальной фазы клетки претерпевают несколько делений. Когда субстрат присутствует в избытке, достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе, синтезируются первичные метаболиты (нуклеотиды, многие ферменты, витамины), из-за большого числа клеток в конце экспоненциальной фазы субстрат расходуется очень быстро, наступает фаза замедления, которая может быть кратковременной. В результате истощения лимитирующего субстрата или накопления продуктов метаболизма, замедляющих рост, увеличение числа клеток постепенно прекращается и культура переходит в стационарную фазу. В это время биомасса остается постоянной, метаболизм претерпевает кардинальные изменения, синтезируются вторичные метаболиты (антибиотики, пигменты), представляющие коммерческий интерес, например антибиотики. Продолжительность стационарной фазы зависит от конкретного микроорганизма и условий роста. В фазе отмирания метаболизм прекращается, так как энергетические запасы клеток оказываются исчерпанными. При промышленном синтезе, еще до наступления фазы отмирания, ферментацию останавливают.

33. В поиске и создании наиболее безопасных и эффективных лекарственных средств большая роль отводится таргетному скринингу. Объясните, что такое таргетный скрининг и как он работает?

Ответ. На примере скрининга антибиотиков. В клинике в настоящее время используется порядка двухсот природных и синтетических антибактериальных веществ. Каждая из них имеет свою мишень. Как правило, это или ферменты, или рибосомный белок. Всего реализованных мишеней также около двухсот. Следовательно, подавляющее количество генов в качестве мишеней для антибактериальных агентов все еще не используется. Для доказательства «существенности» (необходимость гена для жизнедеятельности клетки) генов применяется метод избирательного «выбивания» гена из генома с проверкой выживания организма после такой процедуры,

который представляет большой интерес как технология скрининга веществ. Традиционно первичный отбор последних проводится путем испытания их действия на рост тест-культуры микроорганизма. Высокоактивные вещества, отобранные на этом этапе, проходят дальнейшие испытания, в частности определяется антимикробный спектр их действия и активность в опытах на лабораторных животных, а также токсичность для организма. По завершении доклинических испытаний в случае получения положительных результатов ставится вопрос о передаче препарата в клинику, затем начинается углубленное изучение механизма действия антимикробного средства на субклеточном и молекулярном уровнях, т.е. ведется поиск его внутриклеточной мишени – таргета. Далее выявляется ген, кодирующий образование этой макромолекулы, или гены, которые кодируют образование макромолекул, входящих в макромолекулярный комплекс. По новой технологии скрининга используют информацию о полностью секвенированном геноме патогена и наличии в нем «существенных» генов. В лабораториях, работающих по созданию новых антимикробных средств, предварительно выбирается ген, который будет использован для их испытания как таргет. Таргетный скрининг позволяет в соответствии с выбором гена отбирать биологически активные вещества с запланированным механизмом действия (в отличие от традиционного, когда поиск идет «от клетки к гену»).

34. В процессе ферментации проанализируйте общие закономерности ферментационного процесса при синтезе антибиотиков.

Ответ. Продуценты большинства антибиотиков, в том числе важнейших для медицинской практики, являются аэробами или (реже) факультативными анаэробами. В связи с этим в первые годы после получения пенициллина и др. веществ их продуценты выращивали на поверхности жидкой питательной среды в стационарных условиях в микробиологических матрасах или колбах, помещаемых в термостат или термостатные комнаты. Культура продуцента росла только на поверхности среды. Этот способ был трудоемок, не экономичен и не позволял нарабатывать антибиотик в больших количествах. Очень скоро поверхностная ферментация была заменена на глубинную. Через питательную среду пропускали воздух и среду непрерывно перемешивали. Это позволило использовать для роста продуцента весь объем среды. Только глубинная ферментация создала возможность современного биотехнологического производства с выпуском конечного продукта в большом количестве.

Первая фаза развития культуры продуцента во время ферментационного процесса названа «трофофаза» - фаза сбалансированного роста. Вторая - «идиофаза» или фаза несбалансированного роста. В течение трофофазы антибиотик в культуральной жидкости не обнаруживается или обнаруживается в незначительных количествах. Во время идиофазы прирост биомассы замедляется. Наступает быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости. В трофофазе источники углерода и азота в среде быстро потребляются, и количество их в среде уменьшается. В идиофазе их потребление замедляется, а в конце идиофазы происходит частичный лизис густой культуры мицелия.

Одновременно в культуре можно обнаружить и некоторое количество новых нитей молодого мицелия, который находится уже в условиях среды, обедненной питательными веществами, и участвует в биосинтезе антибиотика.

Таким образом, интенсивному биосинтезу антибиотика способствует значительное уменьшение в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Происходит дерепрессия ферментов синтеза антибиотика. Однако выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, так как незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет, в конечном счете, и к незначительному накоплению антибиотика малым количеством клеток продуцента.

Для высокопродуктивной ферментации необходимо соблюдать определенные условия. Продуценты антибиотиков выращивают на разных средах как относительно простого состава, так и сложного. Последние получили название комплексных сред. В них могут входить соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт и др. природные многокомпонентные источники питательных веществ. Также в среды вносят индивидуальные органические соединения и минеральные соли. Для каждого штамма-продуцента состав оптимальной для биосинтеза антибиотика среды подбирается отдельно. Это относится даже к штаммам одного вида, продуцирующим один и тот же антибиотик. Существуют и некоторые общие закономерности, учитываемые при работе с большинством продуцентов.

Углеродкатаболитная регуляция является одним из механизмов, воздействующих на биосинтез вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза - лучший источник углерода и энергии для любых организмов. Однако быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Показано, что глюкоза ослабляет биосинтез бета-лактамов, аминогликозидов и многих других антибиотиков, образуемых разными продуцентами. Относительно биосинтеза антибиотиков отметим, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза - сильные репрессоры этого процесса. Необходимо подчеркнуть, что продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а сам синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Не является репрессором биосинтеза и лактоза, которая также медленно утилизируется: при ее гидролизе освобождающаяся глюкоза репрессирует бета-галактозидазу и, в результате, гидролиз лактозы (появление в среде глюкозы) замедляется.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно для биосинтеза большинства антибиотиков. Общая причина этого - обогащение клетки макроэргическими фосфорными соединениями (прежде всего АТФ), что повышает скорость роста мицелия. Накапливается много биомассы, но относительно мало антибиотика. Например, высокоактивные штаммы продуцентов тетрациклиновых антибио-

тиков содержат в мицелии меньше АТФ и растут медленнее, чем исходные низкоактивные продуценты тетрациклинов. Неблагоприятное действие фосфора на биосинтез бета-лактамов объясняется на биохимическом уровне следующим механизмом: образование LLD-трипептида - ключевого соединения, с которого начинается синтез пенициллинов и цефалоспоринов, ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Взаимодействие легкоусвояемого сахара и фосфата оказывает отрицательный эффект на биосинтез. Но фосфор не может быть полностью исключен из среды. Биосинтез антибиотиков снижается при его избыточном количестве, поэтому нужно подбирать оптимальное содержание.

Аммоний и другие легкоутилизируемые источники азота подобно легкоокисляемым углеводам усиливают рост продуцентов бета-лактамов, полиеновых антибиотиков (эритромицина, рифамицинов и др.), но отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, БВК (белково-витаминный концентрат) медленно расщепляются в процессе ферментации, т.е. из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов питательных сред, что позволяет получать высокий выход антибиотиков. У продуцентов бета-лактамов механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков связан с уровнем глутаминсинтетазы в мицелии. Известно, что глутамин является донором аминогрупп для ряда аминокислот, а сами аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками бета-лактамовых антибиотиков. Вероятно, что у разных продуцентов механизм этого действия на биосинтез различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез обязательно учитывается при подборе сред, а также осуществляется контроль количества таких соединений.

35. В числе новых лекарственных средств можно рассматривать «антисмысловые олигонуклеотиды». Объясните цели их создания и механизм действия.

Ответ. Известно, что некоторые заболевания (как наследственные, так и ненаследственные) могут быть связаны не с дефицитом конкретного белка или его дефектом, а, наоборот, с гиперпродукцией нормального функционально активного белка. Отсюда следует задача частичного или полного подавления продукции такого белка с разной вариабельностью. Иначе говоря, необходимо избирательно подавлять экспрессию гена, кодирующего этот белок, или гена фермента, участвующего в посттрансляционной модификации данного белка и превращении его в активную форму. В соответствии с этим была выдвинута концепция создания инновационных лекарственных средств, получивших общее название антисмысловые олигонуклеотиды. Предполагается получать комплементарную для ДНК каждого гена (его участка) последовательность нуклеотидов, которая за счет водородных связей будет реагировать с ДНК гена или с информационной РНК, матрицей для которой служит указанная ДНК. В первом случае подавление образования избыточного белка при связывании с геном будет происходить на стадии транскрипции, а во втором (при связывании с информационной РНК) – стадии трансляции. Специфичность антисмысловой последовательности нуклеотидов (избирательность воздействия на выбранный ген) достигается при длине 15-20 нуклеотидов (отсюда название «олигонуклеотиды»).

Для реализации идеи использования антисмысловых олигонуклеотидов как лекарственных средств должен быть преодолен ряд трудностей: необходимо решить проблему направленной доставки их к клеткам – мишеням в организме человека, должна быть обеспечена защита антисмысловых олигонуклеотидов от расщепляющих их нуклеаз. предлагается: модификация таких нуклеотидов в соответствующих лекарственных препаратах, мешающая воздействию на них нуклеаз, но не препятствующая реагированию с ДНК- и РНК-мишенью; упаковка этих нуклеотидов в липосомы и т.д.

36. Приведите методы выведения и очистки ферментов в биотехнологическом производстве.

Ответ. Выделение и очистка ферментов из культуральной жидкости могут быть сопряжены со значительными трудностями. Многие (если не все) из этих перечисленных недостатков могут быть существенно уменьшены путем использования чистых ферментов и, по-видимому, при дальнейших совершенствованиях методов применения ферментов они будут практически решены. В будущем многие традиционные ферментные процессы могут быть заменены использованием многоферментных реакторов, которые способны обеспечить высокоэффективную утилизацию субстратов, обусловить более высокий выход и намного лучшую однородность получаемых продуктов.

Большинство ферментов, используемых в промышленности, являются внеклеточными ферментами, т.е. ферментами, секретлируемыми микроорганизмами во внешнюю среду. Таким образом, если микроорганизм продуцирует ферменты для расщепления больших молекул до ассимилируемых (низкомолекулярных) форм, то ферменты обычно экскретируются в окружающую (культуральную) среду. В таких случаях культуральная (ферментационная) жидкость, получаемая при выращивании микроорганизмов (например, дрожжей или мицелиальных грибов, бактерий), является основным источником протеаз, амилаз и в несколько меньшей степени целлюлаз, липаз и других гидролитических ферментов. Многие промышленные ферменты, являясь гидролазами, могут функционировать без дополнительных сложных кофакторов; они легко выделяются (сепарируются от биомассы) без разрушения клеточных стенок продуцентов и хорошо растворимы в воде. Но поскольку большинство ферментов микроорганизмов по своей природе являются внутриклеточными, то наибольший прогресс в биотехнологии может ожидать именно при их использовании для промышленных целей. Однако в этом случае возникает необходимость разработки эффективных способов их выделения и очистки.

37. Как известно, производство витамина B₁₂ относится к чисто биотехнологическому способу его полу-

чения, когда в качестве продуцента данного витамина используются пропионовые бактерии. Предложите оптимальный метод ферментации и условий ее проведения.

Ответ. Витамин B_{12} – (α -5,6-диметилбензимидазол) – цианкобаламин – является гематопозитическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов. Способность к синтезу данного витамина широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцируют витамин B_{12} *Propionibacterium*, а также *Pseudomonas* и смешанные культуры матанообразующих бактерий. Получение витамина на основе пропионовокислых бактерий, способных к самостоятельному синтезу аденозилкобаламина 5,6 ДМБ (коэнзима B_{12}), осуществляется в две стадии в двух последовательных аппаратах объемом 500 л. Первую стадию культивирования проводят в течение 80 ч и слабом перемешивании в анаэробных условиях до полной утилизации сахара; полученную биомассу центрифугируют. Сгущенную суспензию инкубируют во втором аппарате еще в течение 88 ч, аэрируя культуру воздухом ($2 \text{ м}^3/\text{ч}$). Среда содержит сахара (глюкозу 1–10%), добавки солей железа, марганца, магния и кобальта (10–100 мг/л), кукурузный экстракт (3–7 %). В качестве источника азота принят $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ферментацию проводят при 30°C , pH стабилизируют на уровне 6,5–7,0 подтитровкой культуры раствором $(\text{NH}_4)\text{OH}$. На второй стадии происходит образование ДМБ. После завершения ферментации витамин экстрагируют из клеток, нагреванием в течение 10–30 минут при $80\text{--}120^\circ\text{C}$. При последующей обработке горячей клеточной суспензии цианидом происходит образование CN-кобаламина; продукт сорбируют, пропуская раствор через активированный уголь и окислы алюминия; затем элюируют водным спиртом или хлороформом. После выпаривания растворителя получают кристаллический витамин. Активными продуцентами B_{12} являются бактерии рода *Pseudomonas*. Разработаны эффективные технологии на основе термофильных бацилл *Bacillus circulans*, в течение 18 ч при $65\text{--}75^\circ\text{C}$ в нестерильных условиях. Бактерии выращивают на богатых средах, приготовленных на основе соевой и рыбной муки, мясного и кукурузного экстракта.

38. Приведите классификацию механизмов резистентности к антибиотикам и выделите наиболее опасную.

Ответ. Выделяют следующие механизмы резистентности антибиотиков:

1. Изменение конформации внутриклеточной мишени для данного антибиотика. Антимикробный агент проникает в клетку, но его мишень (транспептидаза пептидогликана, рибосома, ДНК-гираза) его не «связывает» и подавления метаболизма не происходит.
2. Уменьшение проницаемости оболочки микробной клетки для антибиотика. Антибиотик хотя и проникает в клетку, но в незначительных количествах.
3. Появление в оболочке клетки системы активного «выброса», проникающего в клетку антибиотика, вследствие чего его внутриклеточная концентрация не может оказываться высокой.
4. Ферментативная инактивация антибиотика защитными ферментами (наиболее серьезный тип защиты микробной клетки).

Формирование в бактериальной клетке указанных защитных механизмов обусловлено появлением «генов резистентности» не только в хромосоме. Большое внимание привлекают и внехромосомные (плазмидные) генетические элементы микробной клетки – кольцевые молекулы ДНК, имеющие размер в сотни раз меньший, чем хромосомы. Плазмиды, несущие гены резистентности к антибиотикам – R-плазмиды. Основная опасность плазмидной резистентности в генетическом плане состоит в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку конъюгацией (аналог полового процесса) – без деления клетки, однако плаزمида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может быстро передать резистентность большому числу клеток – возник даже термин «инфекционная резистентность» плазмидная резистентность редко встречается лишь в случае первого из перечисленных выше механизмов резистентности, для данного механизма характерны спонтанные мутации в структурном гене. Определяющем структуру той мишени-макромолекулы, с которой «связывается» антибиотик. В результате таких мутаций меняется аминокислотная последовательность в ферменте или в рибосомном белке, что ведет и к изменению конформации молекулы, перестающей связывать антибиотик.

39. После установления механизмов ферментативной инактивации аминогликозидных антибиотиков резистентными к ним бактериями, была осуществлена целенаправленная трансформация аминогликозидов с целью сделать их «нечувствительными» к инактивирующим ферментам. Представьте такую трансформацию аминогликозидных антибиотиков (на примере создания амикацина) как сочетание биосинтеза и оргсинтеза.

Ответ. После установления механизмов ферментативной инактивации аминогликозидных антибиотиков резистентными к ним бактериями начались попытки целенаправленной трансформации молекул аминогликозидов с целью сделать их устойчивыми к ферментам. Так, в молекуле канамицина группа в первом положении в аминоциклитольном фрагменте молекулы была замещена остатком L-амино- α -оксимасляной кислоты. Это привело к общему изменению конформации природной молекулы, при сохранении у нее почти всех функциональных групп. Сохранилась антибактериальная активность, но была в то же время потеряна «чувствительность» ко всем ферментам, распространенным среди резистентных микроорганизмов, инактивирующих аминогликозиды. Полученное производное, названное «амикацин», оказалось высокоэффективным.

40. Факты свидетельствуют, что избавиться от генов резистентности полностью невозможно, а это значительно ослабляет позиции антибактериальных препаратов в лечении различных инфекционных заболеваний. Что такое гены резистентности? Какие организационные мероприятия можно предложить в борьбе с антибиотикорезистентностью?

Ответ. Формирование в бактериальной клетке защитных от антимикробных препаратов механизмов обусловлено появлением «генов резистентности» хромосомной и внехромосомной локализации. Большое внимание привлекают внехромосомные (плазмидные) генетические элементы микробной клетки. Плазмиды, несущие гены резистентности к антибиотикам – R-плазмиды. Основная опасность плазмидной резистентности в генетическом плане состоит в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку конъюгацией (аналог полового процесса) – без деления клетки, однако плазида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может быстро передать резистентность большому числу клеток – возник даже термин «инфекционная резистентность» плазмидная резистентность редко встречается лишь в случае первого из перечисленных выше механизмов резистентности, для данного механизма характерны спонтанные мутации в структурном гене. Определяющим структуру той мишени-макромолекулы, с которой «связывается» антибиотик. В результате таких мутаций меняется аминокислотная последовательность в ферменте или в рибосомном белке, что ведет к изменению конформации молекулы, перестающей связывать антибиотик.

Да, избавиться от генов резистентности полностью невозможно, но можно частоту их распределения минимизировать. Изъятие антибиотика из клинической практики будет означать уменьшение распространенности генов резистентности к нему. Через определенное время (от года до нескольких лет) и близкие к нему препараты восстановят свою эффективность и могут быть возвращены в лечебную практику. Общая стратегия в борьбе с антибиотикорезистентностью может заключаться в последовательной замене одних препаратов другими с возвращением «старых» препаратов в практику через определенный срок. Такая «цикличность» быстрее приведет к желаемым результатам, если она будет соблюдаться в крупных географических регионах.