

ПЕРЕЛІК СИТУАЦІЙНИХ ЗАВДАНЬ
для самостійної підготовки до тестів, модулів і іспиту
з дисципліни
«ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ»
Магістри, спец. 162 «Біотехнологія і біоінженерія»

1. Проаналізуйте переваги біотехнологічного виробництва вітамінів на конкретних прикладах.

Відповідь: Наприклад, вітамін D – це група споріднених сполук, в основі яких знаходиться ергостерин, який виявлений в клітинних мембранах еукаріот. При нестачі в організмі гормону 1,25-дігідроксіхолекальціферол, попередником якого є вітамін D₂, у дітей розвивається рахіт (аналог рахіту у дорослих – остеомалаяція). В якості засобів корекції цих станів застосовуються створені біотехнологічним шляхом лікарські препарати вітаміну D.

Найбільш активні продуценти ергостерину – *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*. У промислових масштабах ергостерин отримують при культивуванні дріжджів і міцеліальних грибів на середовищах з надлишком цукрів при дефіциті азоту, високій температурі і хорошій аерації. Більш інтенсивно ергостерин утворюють дріжджі роду *Candida* на середовищах з вуглеводнями. При отриманні кристалічного препарату вітаміну D₂ культивують цвілеві гриби (*Penicillium*, *Aspergillus*).

2. Для ефективного проведення біотехнологічного процесу велике значення має поживне середовище, в якому мікроорганізми-продуценти БАР використовують як джерело нітрогену різні нітрогеновмісні сполуки, що містять амінний нітроген або іони амонію. Які умови проведення ферментації за джерелом нітрогену при отриманні антибіотиків будуть оптимальними?

Відповідь: Амоній та інші легкоутилізовані джерела нітрогену подібно до легкоокислюваних вуглеводів підсилюють зростання продуцентів беталактамних, полієнових антибіотиків (еритроміцину, рифаміцинів і ін.), Але негативно впливають на їх біосинтез.

Соєве і бавовняне борошно, БВК (білково-вітамінний концентрат) повільно розщеплюються в процесі ферментації, тобто з них повільно вивільняються амінокислоти і іони аммонія, тому їх використовують в якості компонентів поживних середовищ, що дозволяє отримувати високий вихід антибіотиків.

У продуцентів бета-лактамів механізм негативної дії легкозасвоюваних джерел нітрогену на біосинтез антибіотиків пов'язаний з рівнем глутамінсинтетази в міцелії.

Відомо, що глутамін є донором аміногруп для ряду амінокислот, а самі амінокислоти, в свою чергу, є попередниками бета-лактамічних антибіотиків. Імовірно, що у різних продуцентів механізм цієї дії на біосинтез різний.

У будь-якому випадку несприятлива дія легкозасвоюваних джерел азоту на біосинтез обов'язково враховується при підборі середовищ, а також здійснюється контроль кількості таких сполук.

3. Для оптимізації процесу біосинтезу пеніциліну в поживне середовище додають амінокислоти. Як це може позначитися на кількісному виході цільового продукту, якщо додати лізин в значних концентраціях?

Відповідь: Деякі первинні метаболіти є кінцевими продуктами розгалуженого метаболічного шляху. Одне «відгалуження» або один кінець цього шляху закінчується первинним метаболітом, інше «відгалуження» – антибіотиком.

Так, альфа-аміноадіпінова кислота є, з одного боку, прямим попередником лізину, з іншого – бета-лактамів, так як включається в вихідний для його синтезу трипептид. При надлишку лізину відбувається пригнічення утворення альфа-аміноадіпінової кислоти за принципом зворотного зв'язку і, таким чином, знижується синтез не тільки лізину, але і бета-лактамічного антибіотика.

4. У процесі біосинтезу антибіотиків велике значення має вміст вуглецю, азоту і фосфору в поживному середовищі. Як впливає зміна вмісту цих речовин на процес біосинтезу вторинних метаболітів і на процес ферментації в цілому?

Відповідь: Вуглецькатаболітна регуляція є одним з механізмів, що впливають на біосинтез вторинних метаболітів. Відомо, що глюкоза –

найкраще джерело вуглецю та енергії для будь-яких організмів. Однак швидкий катаболізм глюкози різко знижує біосинтез антибіотиків.

Показано, що глюкоза послаблює біосинтез бета-лактамів, аміноглікозидів та інших антибіотиків, утворених різними продуцентами. Щодо біосинтезу антибіотиків відзначимо, що глюкоза, фруктоза, сахароза і галактоза – сильні інгібітори цього процесу.

Необхідно підкреслити, що продукти катаболізму глюкози пригнічують не активність ферментів біосинтезу антибіотиків, а сам синтез цих ферментів. Повільно утилізовані полісахариди (крохмаль та ін.) більш сприятливі для біосинтезу антибіотиків. Не є репресором біосинтезу і лактоза, яка також повільно утилізується: при її гідролізі звільняється глюкоза, що інгібує бета-галактозидазу і в результаті гідролізу лактози (поява в середовищі глюкози) сповільнюється.

Високий вміст в середовищі фосфору (у вигляді неорганічних фосфатних солей) несприятливий для біосинтезу більшості антибіотиків. Загальна причина цього – збагачення клітини макроергічними фосфорними сполуками (перш за все АТФ), що підвищує швидкість росту міцелію.

Накопичується багато біомаси, але щодо відносно мало антибіотику. Наприклад, високоактивні штами продуцентів тетрациклінових антибіотиків містять в міцелії менше АТФ і ростуть повільніше, ніж вихідні низькоактивні продуценти тетрациклінів.

Несприятливий вплив фосфору на біосинтез бета-лактамічних антибіотиків пояснюється на біохімічному рівні наступним механізмом: утворення LLD-трипептида – ключової сполуки, з якої починається синтез пеніцилінів та цефалоспоринів, – інгібується глюкозо-6-фосфатом.

Взаємодія легкозасвоюваного цукру і фосфату дає негативний ефект на біосинтез. Але фосфор не може бути повністю виключений з середовища. Біосинтез антибіотиків знижується при його надмірній кількості, тому потрібно підбирати оптимальний вміст.

5. У біотехнологічному виробництві лікарських засобів велике значення має поживне середовище. Запропонуйте оптимальне поживне середовище в біосинтезі антибіотиків.

Відповідь: Інтенсивному біосинтезу антибіотика сприяє значне зменшення в середовищі джерел вуглецю і азоту, особливо легкозасвоюваних. Відбувається дерепресія ферментів синтезу антибіотика.

Однак вирощування продуцентів з самого початку ферментації на збіднених середовищах недоцільно, так як незначне накопичення біомаси

веде, в кінцевому рахунку, і до незначного накопичення антибіотику малою кількістю клітин продуцента.

Тому замість легко засвоюваних джерел вуглецю використовують повільно утилізовані полісахариди (крохмаль і ін.) і лактозу, які мають незначний вплив на інтенсивність біосинтезу.

6. В даний час до бета-лактамних антибіотиків є дуже високий рівень резистентності. Як пояснити цю ситуацію і чи можна запропонувати способи подолання цього негативного явища, спираючись на скринінг лікарських засобів (ЛЗ)?

Відповідь: Здатність до індукції бета-лактамаз є негативною властивістю бета-лактамних антибіотиків, що пояснює високий рівень резистентності, тому нові бета-лактамні структури оцінюються при вивченні їх властивостей не тільки на стійкість до ферментативної інактивації, а й на здатність індукувати бета-лактамази.

Остання залежить від того, з якою мішенню зв'язується бета-лактамний антибіотик, тому що саме вони є «сенсорами», що запускають складний механізм індукції бета-лактамаз. Схематично цей процес виглядає наступним чином: бета-лактамний антибіотик, що знаходиться в середовищі, реагує з одним з білків, що належать до мішені. Його взаємодія з білком веде до зміни конформації цього білка.

Змінюються біофізичні параметри білка, сигнал про це передається на спеціальний трансмембранний білок, молекула якого перетинає цитоплазматичну мембрану і виходить на її зовнішню поверхню. Далі сигнал послідовно передається на перший і другий цитоплазматичні білки, включені в систему індукції ферментів і, нарешті, на білок-репресор, вже безпосередньо регулюючий експресію саме гена бета-лактамази.

В результаті репресор перестає пригнічувати експресію цього гена. Відповідно, починаються його експресія і синтез молекул інформаційної РНК, яка далі надходить в рибосомну систему, де на ній як на матриці синтезуються молекули бета-лактамаз.

З огляду на безсумнівну подібність багатьох бета-лактамаз з їх ферментами-мішенями був зроблений пошук специфічних інгібіторів бета-лактамаз. Серед природних бета-лактамів і продуктів їх хімічної трансформації були відібрані інгібітори бета-лактамаз, які впливають і на бета-лактамази, і на транспептидази пептидоглікана, тобто такі, що володіють антибактеріальною активністю.

Практична цінність інгібіторів бета-лактамаз обумовлена тим, що їх використовують разом з бета-лактамними антибіотиками, які чутливі до

бета-лактамаз. Інгібітори бета-лактамаз захищають ці антибіотики від ферментативної інактивації. Широкої популярності набули такі інгібітори, як клавуланова кислота і сульбактам і деякі інші.

Однак необхідно враховувати, що будь-який конкретний інгібітор не може впливати на всі численні типи бета-лактамаз. Спектр дії кожного інгібітора обмежений бета-лактамазами лише декількох типів, поширених серед бактерій.

Випускається суміш напівсинтетичного пеніциліну (ампіциліну) з сульбактамом під назвою «уназин». Отримав практичне застосування і препарат аугментин, який є сумішшю амоксициліну (напівсинтетичного пеніциліну) з клавулановою кислотою, і ін.

7. В даний час до тетрацикліну є дуже високий рівень резистентності. Як ви можете пояснити дану ситуацію і чи можна запропонувати способи подолання цього негативного явища?

Відповідь: Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків тетрациклінової групи (тетрацикліну, окситетрацикліну, хлортетрацикліну) набула широкого поширення у зв'язку з їх багаторічним використанням в медицині, а також у тваринництві як ріст-стимулюючих добавок до кормів сільськогосподарських тварин.

Вивчення механізмів резистентності бактерій до тетрацикліну призвело до результатів, що різко відрізняються від тих, що були виявлені в разі бета-лактамінів. Так, ферментативної інактивації тетрацикліну резистентними до них мікроорганізмами виявлено не було.

У рідкісних випадках резистентність була пов'язана з захистом або «екрануванням» від тетрацикліну (інгібіторів білкового синтезу) рибосом. У резистентних штамів був знайдений білок, що запобігає доступу тетрацикліну до місця їх зв'язування на рибосомі.

Найбільш часто зустрічається механізм тетрациклінорезистентності обумовлений змінами, що відбуваються в оболонці, точніше в цитоплазматичній мембрані бактеріальної клітини. Відомо, що в клітинах резистентних штамів тетрацикліни не накопичуються. При цьому в цитоплазматичній мембрані присутні кілька нових білків, які відсутні в мембрані тетрацикліночутливих штамів.

Ці нові білки, що з'являються в цитоплазматичній мембрані при тетрациклінорезистентності, є білками, що складають систему активного «викиду» тетрациклінів, що проникли в клітину. Іншими словами,

тетрацикліни проходять крізь оболонку бактеріальної клітини, в тому числі і через цитоплазматичну мембрану, проте вони не встигають прореагувати з рибосомами, так як швидко видаляються або «викидаються» в середовище.

В даний час в медичну практику впроваджено кілька продуктів хімічної трансформації природних тетрациклінів. Найбільш важливим з них є доксіциклін (6-дезоксі-5-оксітетрациклін), який набагато довше циркулює в організмі, ніж природні тетрацикліни.

8. Біотехнологічне виробництво біопродуктів засноване на використанні біооб'єктів, функції яких на різних етапах процесів біосинтезу різні. Розгляньте варіанти їх використання.

Відповідь: Біооб'єкти характеризуються такими показниками, як рівень структурної організації, здатність до розмноження (або репродукції), наявність або відсутність власного метаболізму при культивуванні у відповідних умовах. Що стосується характеру біооб'єктів, то під цим слід розуміти їх структурну організацію.

В такому випадку біооб'єкти можуть бути представлені молекулами (ферменти, імуномодулятори, нуклеозиди, оліго- і поліпептиди, і т. д.), організованими частками (віруси, фаги, віроїди), одноклітинними (бактерії, дріжджі) і багатоклітинними особинами (нитчасті вищі гриби, рослинні калуси, одношарові культури клітин ссавців), цілими організмами рослин і тварин.

Молекулярні біооб'єкти накладають свій відбиток на організацію та апаратне оформлення відповідних біотехнологічних процесів. Віруси і фаги як облігатні паразити можуть культивуватися тільки на живих клітинах і тканинах, тобто фактично біотехнологічні процеси тут ґрунтуються на використанні клітин, заражених вірусами або несучих вірус(-и). Одноклітинні види прокариотів і еукаріотів можуть використовуватися в біотехнологічних процесах у вигляді монокультур або в асоціаціях.

Для порівняння можна назвати виробництво будь-якого антибіотика (пеніциліну, рифаміцину і ін.) за допомогою чистої культури відповідного продуцента, а також виробництво кефіру за допомогою кефірних «зерен» («грибків»), до складу яких входять лактобактерії і дріжджі. Отже, в останньому випадку застосовують природну асоціацію мікроорганізмів, і кефір є продуктом змішаного бродіння – молочнокислого і спиртового.

9. Суперпродуцент – це біоб'єкт промислового використання. Як можна отримати його і якими властивостями він повинен володіти на відміну від природного штаму культури?

Відповідь: суперпродуцент – мікробний штам, націлений на синтез певного продукту в високій концентрації. Суперпродуцентів можна отримати, застосовуючи методи мутагенезу, клітинної та генної інженерії. Відмінні риси суперпродуцентів від природних штамів: максимальний вихід цільового продукту, стабільність, економічність, відсутність патогенності, відсутність навіть «слідів» мікробних токсинів, утворений суперпродуцентом цільовий продукт не повинен розщеплюватися протеазами клітини, бажано, щоб у суперпродуцентів цільового продукту останній виводився з клітини в поживне середовище, що значно полегшить його подальше виділення і очищення.

10. Проведіть порівняльну характеристику калусних і суспензійних культур при використанні їх в якості субстрату для отримання БАР біотехнологічними методами.

Відповідь: Використання нових технологій отримання біомаси лікарських рослин у вигляді калусних і суспензійних культур має ряд загальних переваг:

- стандартність накопичуваної сировини;
 - високий вихід активного початку;
 - скорочення термінів культивування для накопичення рослинної біомаси;
 - можливість промислового виробництва біомаси екзотичних рослин, малодоступних для нашої країни, наприклад, таких як раувольфія, діоскорея, унгернія та ін.;
 - використання різних технологічних режимів;
 - використання методів іммобілізації і біотрансформації для підвищення виходу продуктів вторинного метаболізму стосовно до рослинних клітин.
- Загальні особливості культур рослинних клітин, що ускладнюють роботу з їх культурами:
- розміри клітин рослин (15-1000 мкм) в 50-100 разів більше, ніж клітин бактерій;
 - в результаті зростання клітин рослин у них з'являється велика вакуоль, при цьому всі фізичні і хімічні константи клітин змінюються;
 - культури клітин рослин мають целюлозний стінку.

Використання технології отримання калусних культур з рослинної сировини дає такі переваги, як надійність і стабільність по виходу біомаси та

продуктів вторинного метаболізму, а також можливість використання калусних систем для іммобілізації з подальшою біотрансформацією. Недолік калусного культивування – застосування ручної праці.

З порівняння калусних і суспензійних культур виходить, що вихід продуктів вторинного метаболізму вище саме в калусних культурах, але при цьому управління процесом культивування легше здійснювати при роботі з суспензійними культурами.

Є вигідні відмінності при застосуванні іммобілізованих калусних клітин від суспензійних культур: багаторазове використання, чітке відділення біомаси від продуктів метаболізму, збільшення тривалості культивування на стадії активного біосинтезу, отримання більшої кількості вторинних метаболітів, скорочення часу ферментації, збільшення терміну роботи клітин. Слід зазначити, що синтез метаболітів в суспензійній культурі зупиняється на проміжних етапах, не доходячи до отримання необхідного цільового продукту.

В цьому випадку отримання кінцевого продукту можливо, лише завдяки процесу біотрансформації, сутність якого полягає в зміні проміжних метаболітів за допомогою культур інших рослин або клітин бактерій із метою підвищення біологічної активності конкретної хімічної структури.

Більшість калусних тканин ростуть в умовах слабкого освітлення, тому що вони не здатні до фотосинтезу. Для більшості калусних рослин важлива оптимальна температура (26°C).

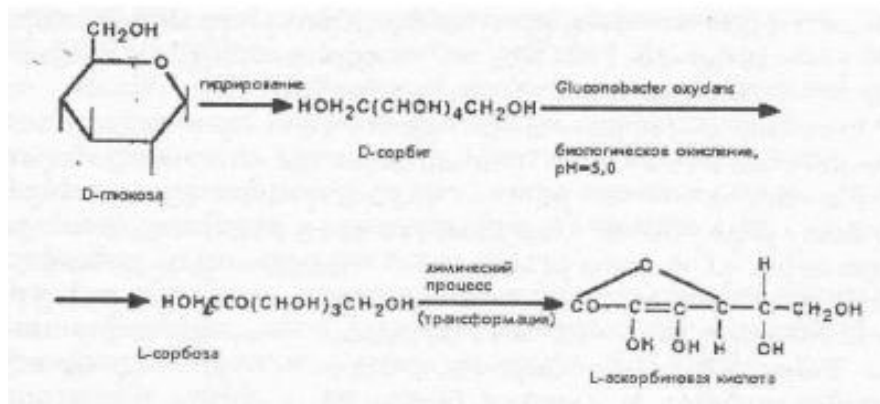
Через низьку інтенсивність дихання цих клітин потреба в кисні відповідно знижена, і необхідність в забезпеченні даних культур системною інтенсивною аерацією відпадає. Оптимальна вологість для зростання культури зазвичай становить 60-70%.

Важливий підбір інгредієнтів середовища культивування: використовують рідкі багатокomпонентні середовища, що містять макроелементи, мікроелементи, джерела заліза, вітаміни, фітогормони, ауксини, цитокіни, джерела вуглецю.

11. Отримання субстанції аскорбінової кислоти є багатостадійним процесом в якому поєднуються методи органічного і мікробіологічного синтезу. Який попередник аскорбінової кислоти отримують з використанням біотехнології і яке значення цього етапу для всього процесу в цілому?

Відповідь: Аскорбінова кислота, або вітамін С – це вітамін, наявний у всіх вищих рослин і тварин; тільки людина і мікроби не синтезують її, але людям вона необхідна, а мікроби не потребують її.

I, тим не менше, певні види оцтовокислих бактерій причетні до біосинтезу напівпродукту цієї кислоти – L-сорбози. Таким чином, весь процес отримання аскорбінової кислоти є змішаним, тобто хіміко-ферментативним.



Біологічна стадія процесу каталізується мембранозв'язаною поліальдегідрогеназою, а остання (хімічна) включає послідовно наступні етапи: конденсація сорбози з діацетоном і отримання діацетон-L-сорбози, окислення діацетон-L-сорбози до діацетон-2-кетогулонової кислоти, яка потім піддається гідролізу й енолізації з подальшою трансформацією в L-аскорбінову кислоту.

12. Організація будь-якого біотехнологічного виробництва передбачає підготовчий і основний етапи роботи. Які види робіт необхідно провести в даному випадку?

Відповідь: В загальному вигляді будь-який біотехнологічний процес включає три основні стадії: передферментаційну, ферментаційну і постферментаційну. Принципова схема реалізації біотехнологічних процесів в загальному вигляді може бути представлена блок-схемою, в якій зроблена спроба охопити всі варіанти ферментацій процесів. На передферментаційній стадії здійснюють зберігання та підготовку культури продуцента (інокулята), отримання та підготовку поживних субстратів і середовищ, ферментаційної апаратури, технологічної та рециркульованої води і повітря.

У відділенні чистої культури здійснюють зберігання виробничих штамів і забезпечують їх реактивацію і напрацювання інокулята в кількостях, необхідних для початку процесу. При вирощуванні посівних доз інокулята застосовують принцип масштабування, тобто проводять послідовне нарощування біомаси продуцента в колбах, бутлях, далі в серії послідовних ферментерів. Кожен наступний етап даного процесу відрізняється за обсягом від попереднього зазвичай на порядок.

Отриманий інокулят стерильною посівною лінією направляється далі в апарат, в якому реалізується ферментаційна стадія. Приготування поживних середовищ здійснюється в спеціальних реакторах, обладнаних мішалками. Дозування поживних компонентів підбирається і здійснюється індивідуально на кожному виробництві відповідно до технологічним регламентом конкретного процесу.

Стадія ферментації є основною стадією в біотехнологічному процесі, так як в її ході проходить взаємодія продуцента з субстратом і утворення цільових продуктів (біомас, ендо- та екзопродуктів). Ця стадія здійснюється в біохімічному реакторі (ферментері). Постферментаційна стадія забезпечує отримання готової товарної вугільної продукції та також, що не менш важливо, знешкодження відходів і побічних продуктів.

Залежно від локалізації кінцевого продукту (клітина або культуральна рідина) і його природи на постферментаційній стадії застосовують різну апаратуру і методи виділення і очищення. Найбільш трудомістким є виділення продукту, що накопичується в клітинах.

Першим етапом постферментаційної стадії є фракціонування культуральної рідини і відділення зависної фази – біомаси. Найбільш поширений для цих цілей метод – сепарація, здійснювана в спеціальних апаратах – сепараторах, які працюють за різними схемами в залежності від властивостей оброблюваної культуральної рідини.

Для збільшення термінів придатності біотехнологічних продуктів роблять їх зневоднення і стабілізацію.

13. При отриманні генно-інженерного інсуліну які мікроорганізми використовують як продуцентів?

Відповідь: Генно-інженерний інсулін був вперше синтезований за допомогою *E. coli*, синтезовані обидві ланцюги людського інсуліну, які потім були з'єднані в молекулу біологічно активного гормону. Щоб одноклітинний організм зміг синтезувати на своїх рибосомах молекули інсуліну, його забезпечили потрібною програмою, тобто ввели йому ген гормону. Ген, що програмує біосинтез попередника інсуліну або два гени, що програмують окремо біосинтез ланцюгів А і В інсуліну, отримали хімічним способом. Наступний етап – включили ген попередника інсуліну (або гени ланцюгів інсуліну порізно) в геном *E. coli*. З *E. coli* виокремили плазмиду відповідною рестриктазою.

Синтетичний ген вбудували в плазмиду (клонуванням з функціонально активною С-кінцевою частиною β -галактозидази *E. coli*). В результаті *E. coli*

набула здатності синтезувати білковий ланцюг, що складається з β -галактозидази і інсуліну.

Синтезовані поліпептиди відокремили від ферменту хімічним шляхом, потім провели їх очищення. В даний час в масовому виробництві людського інсуліну використовують технологію рекомбінантних ДНК, поміщаючи ДНК гене людського проінсуліну в *E. coli* або *S. cerevisiae* і гідролізуючи напрацьований проінсулін до молекули інсуліну.

14. Проаналізуйте можливість успішного поєднання біосинтезу, органічного синтезу і біотрансформації на прикладі отримання бета-лактамних антибіотиків.

Відповідь: Біосинтез антибіотика здійснюється мікроорганізмами на певному етапі їх розвитку. Ця закономірність характерна для бактерій, міцеліальних грибів (*Penicillium chrysogenum* та ін.).

Максимально високу активність штаму-продуцента здатна забезпечити технологія рекомбінантних ДНК, так як можна створювати нові антибіотики з унікальною структурою, які мають більш потужний вплив на визначені мікроорганізми і володіють мінімальними побічними ефектами. З накопиченням певної концентрації антибіотика зростання мікроорганізмів припиняється. Це стадія біосинтезу.

З культуральної рідини антибіотик, де він знаходиться у вигляді кислоти, виділяють шляхом екстракції неполярними органічними розчинниками (амілацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом та ін.).

Очищення антибіотика проводять шляхом заміни розчинників, оскільки солі пеніциліну погано розчиняються в органічних розчинниках. Екстрагований пеніцилін у вигляді кислоти переводять у водний розчин у вигляді солі, додаючи луг. Повторюючи ці операції, пеніцилін концентрують і очищають.

Це стадія органічної обробки пеніциліна. В даний час велике практичне значення має напівсинтетичний (біологічний + хімічний) спосіб отримання аналогів природного пеніциліну. Вихідним продуктом служить 6-амінопеніцилланова кислота (6-АПК).

Використовується іммобілізована пеніцилінацилаза, яка гідролізує бензилпеніцилін з утворенням 6-АПК і фенілоцтової кислоти. Сама по собі 6-АПК не активна. Її піддають хімічному ацилюванню і отримують аналоги пеніциліну з поліпшеними або новими властивостями. Деякі з них: оксацилін, ампіцилін, метіцилін, амоксицилін та інші. Стадія біотрансформації.

15. При виробництві пеніциліну на початку ферментації було додано в поживне середовище певна кількість фенілоцтової кислоти, що призвело до зниження виходу цільового продукту. Яка помилка була допущена в даному процесі?

Відповідь: Синтез того чи іншого пеніциліну залежить від наявності специфічної речовини в середовищі, інакше кажучи, попередника, який мікроорганізм включає в молекулу антибіотика без попереднього розщеплення.

Слід зазначити, що попередники біосинтезу пеніциліну (фенілоцтова кислота, фенілацетамід, феноксіоцтова кислота) при певних концентраціях і рН середовища завдають токсичного впливу на продуцента. Фенілоцтова кислота найменш токсична.

Додавання її в середовище в концентрації вище 500 мкг/мл пригнічує ріст міцелію, особливо в перші 24 годин його розвитку. Фенілоцтова кислота додається в концентрації від 100 до 500 мкг/мл через 24 год розвитку *P. chrysogenum*.

16. Відомо, що вимоги екології часто не збігаються з технологічним регламентом фармацевтичного виробництва в цілому і біотехнологічного зокрема. Які види очищення і для якого роду відходів передбачають використання активного мулу і штамів-деструкторів?

Відповідь: Кожне біовиробництво має забезпечити захист:

- сировини, проміжних і кінцевих продуктів – від будь-якого забруднення;
- персоналу – від субстанцій, з якими вони працюють;
- навколишнього середовища – від речовин, які при відсутності відповідних заходів і контролю можуть потоком повітря вийти назовні з біопідприємства.

При необережній роботі з рекомбінантними штамами не виключено їх потрапляння в навколишнє середовище, де вони можуть викликати неконтрольовані мутації не тільки у мікроорганізмів, але і у інших видів живих істот.

Це вимагає від персоналу, зайнятого в розробці і реалізації біотехнологічних процесів із використанням прийомів генної інженерії, більшої відповідальності і виробничої дисципліни.

Перед остаточним видаленням з установки всі рекомбінантні мікроорганізми повинні бути інактивовані відповідно до певних інструкцій. Відпрацьоване культуральне середовище ретельно перевіряють на наявність в ньому життєздатних мікроорганізмів, щоб виключити їх попадання в навколишнє середовище.

Серйозні екологічні проблеми виникають у зв'язку з захистом водойм від стічних вод, що утворюються у великих об'ємах при біотехнологічному процесі. Основа очищення стічних вод і захисту від них водойм – дорогі спеціальні очисні споруди, а також замкнуті системи водообігу. Перед спуском стічних вод в очисні споруди відпрацьовані нативні розчини піддають попередньо УФ-опроміненню з одночасним введенням окисника, що дозволяє зруйнувати високомолекулярні органічні сполуки з утворенням низькомолекулярних речовин, що піддаються біологічному окисленню в системі очисних споруд.

У «години пік» бажано епізодичне використання комерційних препаратів – генно-інженерних штамів-деструкторів, наприклад бактерій роду *Pseudomonas*, клітини яких містять оксидоредуктази і гідроксилази, здатні розкласти велике число молекул вуглеводнів та ароматичних сполук, таких як бензол, ксилол, толуол. Перевага бактеріального очищення в порівнянні з хімічним в тому, що воно не викликає появи нового забруднюючого агента в навколишньому середовищі.

В основі біологічної очистки води лежить діяльність активного мулу (АМ) або біоплівки, природно виникаючого біоценозу, що формується на кожному конкретному виробництві в залежності від складу стічних вод і обраного режиму очищення. Активний мул являє собою темно-коричневі пластівці, розміром до декількох сотень мікрметрів.

На 70% він складається з живих організмів і на 30% – з твердих частинок неорганічної природи. Живі організми разом з твердим носієм утворюють зооглею – симбіоз популяцій мікроорганізмів, вкритий загальною слизовою оболонкою. Мікроорганізми, виділені з активного мулу відносяться до різних родів: *Actinomyces*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Desulfomonas*, *Pseudomonas*, *Sarcina* та ін. Найбільш численні бактерії роду *Pseudomonas*, про які згадувалося раніше.

17. В умовах біотехнологічного виробництва які вітаміни групи В можуть бути отримані з використанням мікробіологічного синтезу?

Відповідь: Вітамін В₁₂ – ціанкобаламін – що є гематопоетичним і ростовим фактором для багатьох тварин і мікроорганізмів. Мікробіологічний синтез є єдиним способом отримання даного вітаміну. Здатність до синтезу даного вітаміну широко поширена серед прокаріотичних мікроорганізмів. Активно продукує вітамін *Pseudomonas*. Вітамін В₂ (рибофлавін): мікроорганізми синтезують рибофлавін і дві його коферментні форми – ФАД і ФМН.

Продуцентами вітаміну є бактерії (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дріжджі (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), мікроскопічні (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) і цвілеві гриби (*Aspergillus niger*). Промислове отримання рибофлавіну здійснюється хімічним синтезом, мікробіологічними та комбінованим: при цьому синтезована мікроорганізмами рибоза хімічно трансформується в В₂.

Вітамін В₅ (пантотенова кислота): біосинтез пантотенової кислоти здійснюється з пантоєвої кислоти. Більшість мікроорганізмів є пантотенатпрототрофними, тобто здійснюють біосинтез пантотенової кислоти. Її катаболізм у мікроорганізмів починається з гідролізу вітаміну до D-пантоєвої кислоти і β-аланіну; D-пантоєва кислота в послідовних реакціях перетворюється на 2-оксоізовалеріанову кислоту.

18. Удосконалення біооб'єктів як джерел біопродуктів включає кілька напрямків. Визначте ці напрямки відповідно до цільових завдань.

Відповідь: Біотехнологія зацікавлена в удосконаленні біооб'єкту незалежно від того, на якому щаблі «сходів живих істот» знаходиться цей біооб'єкт. Якщо організм, виділений з природного середовища, не буде підданий вдосконаленню, то виробничий процес утворення цільового продукту або економічно недоцільний, або технічно важкоздійснюваний. Клітинна інженерія – це один з основних розділів сучасної біотехнології, заснований на виділенні і культивуванні тканин і клітин вищих багатоклітинних організмів.

Культивування тканин і клітин відбувається поза організмом – *in vitro* («в пробірці, в колбі, в скляному посуді»), в спеціально підібраних умовах. Використання культур клітин дозволяє подолати багато проблем біоетики (біологічної етики), пов'язані з умертвінням тварин.

Крім того, в культурі можна вирощувати суворо визначені клітини в необмеженій кількості. На культурах клітин отримують вакцини, наприклад, проти кору, поліомієліту.

Зберігаючи культури клітин, можна зберігати генотипи окремих організмів і створювати банки генофондів цілих видів. Наприклад, при отриманні моноклональних антитіл використовуються клітинні гібриди між лімфоцитами імунізованих тварин і клітинами міеломи, що інтенсивно розмножуються. Отримані первинні дікаріони утворюють справжні гібридні клітини, які інтенсивно розмножуються за рахунок генома пухлинних мієломних клітин і одночасно виділяють велику кількість антитіл, за рахунок роботи геному імунізованих лімфоцитів.

Цей прийом дозволяє одержувати велику кількість гібридомних клітин, що виробляють великі кількості необхідних антитіл. Важливою складовою частиною біотехнології є генетична інженерія. Мета прикладної генетичної інженерії полягає в конструюванні таких рекомбінантних молекул ДНК, які при впровадженні в генетичний апарат надавали б організму властивості, корисні для людини.

Наприклад, отримання «біологічних реакторів» – мікроорганізмів, рослин і тварин, які продукують фармакологічно значущі для людини речовини, створення сортів рослин і порід тварин з певними цінними для людини ознаками. Методи генної інженерії дозволяють провести генетичну паспортизацію, діагностувати генетичні захворювання, створювати ДНК-вакцини, проводити генотерапію різних захворювань.

19. При промисловому одержанні рекомбінантних білків вибір мікроорганізму-продуцента залежить від багатьох чинників. Визначте критерії відбору мікроорганізму.

Відповідь: Успіхи генетичної інженерії привели до того, що понад 100 білків людини (біорегуляторів, коректорів гомеостазу, факторів вродженого набутого імунітету) можуть зберігати свою видоспецифічність.

Вони напрацьовуються як лікарські засоби шляхом мікробіологічного синтезу. При цьому технологія рекомбінантних ДНК дозволяє їх удосконалювати: підвищувати фізіологічну активність, знижувати імовірність побічних реакцій після введення і т. п.

При виборі мікроорганізмів (як продуцента чужорідних білків передбачуваного лікарського препарату) необхідно найбільш повно вивчити геном, детально дослідити метаболізм на рівні виду, щоб мікроорганізм володів помірною патогенністю (в ідеалі передбачається її повна відсутність), щоб мікроорганізм був здатний рости в умовах виробництва на недефіцитних і економічно доступних середовищах.

Обрані в якості передбачуваних продуцентів мікроорганізми оцінюються і вивчаються вже на рівні конкретних штамів. При необхідності штами-біооб'єкти (як носії чужорідного генетичного матеріалу і продуценти чужорідного білка) можуть бути вдосконалені методами генетичної інженерії, що дозволяє звести до мінімуму імовірність протеолізу чужорідних білків, гідролізу чужорідної інформаційної РНК і виключення чужорідних генів з генома.

20. При вдосконаленні біотехнологічного виробництва активно використовується іммобілізація біооб'єкту. Які технологічні проблеми виробництва біопродуктів вирішує інженерна ензимологія?

Відповідь: Основна задача інженерної ензимології – розробка біотехнологічних процесів, в яких використовується каталітична дія ферментів, що виділені зі складу біологічних систем або знаходяться всередині клітин, штучно позбавлених здатності рости. В основі сучасної ензимології лежить застосування іммобілізованих ферментів і ферментних систем.

Іммобілізація – це процес прикріплення ферментів до поверхні природних або синтетичних матеріалів, включення їх в полімерні матеріали, порожнисті волокна і мембранні капсули, поперечне хімічне зшивання. В результаті іммобілізації ферменти набувають переваги гетерогенних каталізаторів – їх можна видаляти з реакційної суміші (і відділяти від субстратів і продуктів ферментативної реакції) простою фільтрацією.

Цим усувається перший з перерахованих недоліків розчинних ферментів як технологічних каталізаторів. З'являється також можливість переведення багатьох періодичних ферментативних процесів на безперервний режим. Іммобілізовані ферменти більш стійкі до зовнішніх впливів, таким чином виникла можливість подолання другого недоліку розчинних ферментів – їх лабільності.

Висока субстратна специфічність ферментативного каталізу і унікальна здатність прискорювати реакції в десятки і сотні разів в умовах нормального тиску і фізіологічних температур дозволяють отримувати високі виходи продуктів і створювати практично безвідходні біотехнологічні процеси, які не забруднюють навколишнє середовище.

21. На підставі класифікації біосинтезу за матеріальними потоками проведіть порівняльну характеристику режимів ферментації в залежності від цільового продукту біотехнологічного виробництва.

Відповідь: *Періодична культура з додаванням субстрату* передбачає періодичне внесення в ферментер зростаючої кількості поживних речовин. При цьому культуральне середовище не видаляють до закінчення процесу. Періодичне додавання субстрату призводить до подовження експоненційної і стаціонарної фаз, до збільшення біомаси та кількості метаболітів, що синтезуються під час стаціонарної фази.

Для забезпечення безперервного синтезу рекомбінантного білка і його стабільності необхідний ретельний контроль процесу і додавання субстрату (джерела вуглецю, азоту, вітамінів, мікроелементів та інших БАБ) одразу ж, як в цьому виникає необхідність.

Залежно від генотипу мікроорганізму і природи рекомбінантного білка періодична ферментація з додаванням субстрату може підвищити вихід готового продукту на 25-1000% в порівнянні з простою періодичною ферментацією.

Періодична ферментація з додаванням субстрату використовується також для культивування клітин ссавців і комах; ці культури широко застосовують для отримання білкових продуктів, що мають медичне значення, крім того, без періодичного додавання субстрату, клітини ссавців неефективно синтезують чужорідні білки. Для періодичної ферментації характерні невеликі відмінності у часі збору клітин, який проводять, починаючи з середини експоненційної фази, і закінчують її пізнім етапом.

При *безперервній ферментації* свіже культуральне середовище надходить в ферментер безперервно, паралельно відводиться такий же об'єм клітинної суспензії. Таким чином, спад числа клітин (видалення продукту) врівноважується їх збільшенням в результаті поділу. При цьому жорстко контролюють швидкість притоку культурального середовища і постійний об'єм культури в біореакторі.

Переваги безперервної ферментації:

- при безперервній ферментації потрібні не настільки громіздкі біореактори і обладнання для збору клітин, їх руйнування, подальшого очищення білкового продукту або метаболіта, синтезованого мікроорганізмом;
- біореактор періодичної дії час від часу розвантажують, готують до повторного використання (ремонт, чистка, стерилізація біореактора - основна причина зниження ефективності процесу); для ферментера, що працює в безперервному режимі, простій істотно менший;

– при безперервній ферментації синтез цільового продукту відбувається більш злагоджено, оскільки фізіологічний статус більшості клітин однаковий.

Безперервну ферментацію використовують для промислового отримання білків одноклітинних мікроорганізмів та антибіотиків, проте, цей спосіб вирощування мікроорганізмів пов'язаний з певними утрудненнями:

– тривалість ферментації в безперервному режимі становить іноді 500-1000 год, протягом якого деякі клітини можуть втратити рекомбінантні плазміди;
– в промислових установках важко протягом тривалого часу підтримувати стерильні умови; безперервні процеси вимагають наявності стерильного резервного обладнання, що значно збільшує основні витрати.

22. Знаючи молекулярні механізми внутрішньоклітинної регуляції у мікробної клітині, можна керувати процесами біосинтезу. Який вплив ретроінгібування на вихід цільового продукту – амінокислоти лізину?

Відповідь: Ретроінгібування – пригнічення кінцевим продуктом активності першого ферменту метаболічного процесу. Наприклад, щойно концентрація кінцевого метаболіту стає достатньою для задоволення потреб клітини, метаболіт починає негативно впливати на свій власний біосинтез.

В результаті пригнічується активність першого ферменту, що тягне за собою припинення утворення не тільки метаболіти, а й усіх його проміжних попередників. Тобто, якщо клітині в даний момент кінцевий метаболіт не потрібен, то не потрібні і його попередники.

Оскільки кінцевий метаболіт вже припинив своє утворення, але продовжує витрачатися, природно, що концентрація його в клітці знижується. Як тільки вона досягає відповідної нижньої межі, синтез метаболіту швидко починається знову через те, що метаболіт як інгібітор свого біосинтезу взаємодіє (за рахунок водневих зв'язків) з алостеричним центром початкового ферменту метаболічного ланцюжка. Тому фермент зберігає потенційну здатність знову швидко перейти в активний стан, що і відбувається після звільнення алостеричного центру від інгібітора, внаслідок зниження його концентрації.

Біотехнолог може подолати механізм ретроінгібування і змусити клітину безперервно напрацьовувати метаболіт. По-перше, можна безперервно видаляти утворений метаболіт з поживного середовища і таким чином знижувати його внутрішньоклітинну концентрацію.

Це досягається внесенням в середовище сорбента: в результаті концентрація розчиненого метаболіту (цільового продукту) знижується, і механізм ретроінгібування не вмикається.

По-друге, можна використовувати генно-інженерні методи – сконструювати продуцент з мутацією в аллостеричному центрі початкового ферменту метаболічного ланцюжка. При цьому зміни в конформації аллостеричного центру повинні не мінятися під дією інгібітора. В цьому випадку ретроінгібування вже не буде обмежувати синтез даного метаболіту. По-третє, необхідний спеціальний контроль за складом середовищ, які використовуються при ферментації.

У них має бути обмежена кількість метаболіту (цільового продукту), що запобіжить можливості його негативного впливу на власний біосинтез в клітинах продуцента. Вельми ілюстративний приклад невдачі при біосинтезі пеніциліну (продуцент *Penicillium chrysogenum*) на комплексному, багатому на лізин середовищі, що використовується в якості добавки до деяких дешевих і недефіцитних комплексних середовищ. Лізин є первинним метаболітом, пеніцилін – вторинним.

Одним з попередників лізину є аміноадипінова кислота, яка входить до складу так званого LLD-трипептиду, з якого в результаті ряду наступних реакцій формується молекула пеніциліну. Тому лізин, пригнічуючи власний біосинтез за механізмом ретроінгібування, одночасно пригнічує і біосинтез аміноадипінової кислоти, а відтак і пеніциліну. Т

Таким чином, для біотехнологів, які працюють в антибіотичній промисловості, виникає актуальне завдання підбору середовищ з обмеженою кількістю лізину або створення виробничих штамів *Penicillium chrysogenum* з порушеним механізмом ретроінгібування по лізину.

23. При отриманні БАР зростання калусних тканини в процесі ферментації здійснюється в кілька етапів. В якій фазі необхідно стимулювати активність клітин?

Відповідь: Калусна тканина – один з видів клітинного диференціювання, виникає шляхом неорганізованої проліферації дедиференційованих клітин органів рослини. Одним з найважливіших гормонів, що застосовуються в початкових фазах культивування калуса *in vitro* є ауксин, який активує розподіл і розтягнення клітин.

Вважається, що надходження ауксина в клітину сприяє посиленню секреції кислих гідролаз і полісахаридів, необхідних для подальшого

зростання клітинних стінок. Все це призводить до значного прискорення темпів розмноження клітин.

У циклі вирощування калусних тканин клітини після ряду поділів приступають до зростання розтягуванням, диференціюються як зріла калусна тканина і деградують. Для того, щоб не сталося старіння, втрати здатності до поділу і подальшого зростання, а також відмирання калусних клітин, первинний калус переносять на свіже поживне середовище через 28-30 днів, тобто проводять пасивування або субкультивування калусних тканини.

24. Виробництво ферментів має певну специфіку їх отримання за допомогою біотехнології. Визначте цю специфіку відповідно до властивостей самих ферментів.

Відповідь: При біотехнологічному виробництві ферментів (Ф) слід враховувати, що синтез багатьох Ф репресується легкозасвоюваними джерелами вуглецю (глюкозою, фруктозою, манозою та ін.); цей ефект носить назву катаболітної репресії (іноді глюкозним ефектом). До катаболітної репресії схильний біосинтез таких Ф, як α -амілаза, целулаза, глюкоамілаза, інвертаза, транселіміназа полігалактуранової кислоти.

Ферменти, що каталізують перетворення азотовмісних субстратів, також регулюються за механізмом катаболітної репресії; їх біосинтез репресується іонами амонію або швидкозасвоюваними амінокислотами. Амінокислоти в анаеробних умовах культивування ініціюють біосинтез відповідних декарбоксилаз.

При наявності в середовищі великої концентрації сечовини стимулюється біосинтез уреаз. Введення в середовище культивування аргініну індукуює біосинтез аргінази. Джерелами органічного азоту можуть служити пептони, триптон, дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну або будь-яка їх суміш.

Наявність в середовищі культивування різних біополімерів обумовлює одночасне накопичення комплексу протеаз, амілаз, нуклеаз, ліпаз.

На зростання мікроорганізмів і біосинтез Ф істотний вплив роблять іони кальцію, марганцю, цинку та інші. Іони заліза і магнію активують і стабілізують протеолітичні ферменти.

Присутність іонів заліза і міді в середовищі культивування суттєва для біосинтезу залізо- і мідєвмісних Ф, що беруть участь, як правило, в окисно-відновних реакціях (утилізації і перетворення енергії). Відсутність таких іонів може негативно відбитися на швидкості багатьох метаболічних процесів і на біосинтезі Ф, що каталізують ці процеси.

25. При впровадженні технології суспензійного культивування: Які основні властивості рослинних клітин необхідно враховувати? Як це пов'язано з вибором режиму ферментації і об'ємною будовою ферментера?

Відповідь: Рослинні клітини і тканини мають свої особливості, що ускладнюють роботу з їх культурами: 1) розміри клітин рослин (15-1000 мкм) в 50-100 разів більше, ніж клітин бактерій; 2) в результаті зростання клітин рослин у них з'являється велика вакуоль, при цьому всі фізичні і хімічні константи клітин змінюються; 3) суспензійні культури складаються з клітин-агрегатів різного розміру; 4) культури клітин рослин мають целюлозну стінку, що також дуже ускладнює роботу.

При промисловому вирощуванні суспензійних культур застосовують біореактори, в яких процеси глибинного культивування ведуть до збільшення біомаси та синтезу вторинних сполук. Виділяють біореактори, в яких суспензійна культура перемішується тільки за рахунок подачі повітря, і біореактори, в яких суспензійна культура перемішується механічним шляхом.

Культури рослинних клітин вирощують в одному з двох режимів:

- 1) перший – періодичне культивування, при якому після закінчення процесу біосинтезу відкачують і використовують всю суспензію клітин;
- 2) напівперіодичне культивування, при якому в біореактор постійно додають певний об'єм свіжого поживного середовища і одночасно забирають той же обсяг або клітинної суспензії, або відпрацьованого поживного середовища, залишаючи при цьому клітинну масу в реакторі.

Здебільшого рослинні клітини вирощують в періодичному режимі.

Через низьку інтенсивність дихання рослинних клітин потреба в кисні відповідно знижена, і необхідність в забезпеченні даних культур системною інтенсивною аерацією відпадає.

У зв'язку з цим при впровадженні технології суспензійного культивування треба підбирати відповідні типи біореакторів з об'ємом не більше 20 м³ і з системами особливого перемішування (висхідний потік повітря, струшування), щоб не зруйнувати рослинні клітини.

При порівнянні ферментерів різних типів встановлено, що максимальний синтез вторинних метаболітів в суспензійній культурі відбувається при подачі повітря знизу. Оптимальна вологість для зростання культури зазвичай становить 60-70%.

Важливий підбір інгредієнтів середовища культивування: використовують рідкі багатокomпонентні середовища, що містять макроелементи, мікроелементи, джерела заліза, вітаміни, фітогормони, ауксини, цитокініни, джерела вуглецю.

26. Які етапи роботи в біотехнологічному виробництві біопродуктів передбачає підготовча стадія?

Відповідь: На предферментаційній стадії здійснюють зберігання та підготовку культури продуцента (інокулята), отримання та підготовку поживних субстратів і середовищ, ферментаційної апаратури, технологічної і рециркульованої води і повітря.

У відділенні чистої культури здійснюють зберігання виробничих штамів і забезпечують їх реактивацію і напрацювання інокулята в кількостях, необхідних для початку процесу. При вирощуванні посівних доз інокулята застосовують принцип масштабування, тобто проводять послідовно нарощування біомаси продуцента в колбах, бутлях, далі в серії послідовних ферментерів. Кожен наступний етап даного процесу відрізняється за об'ємом від попереднього зазвичай на порядок.

Отриманий інокулят стерильною посівною лінією направляється далі в апарат, в якому реалізується ферментаційна стадія. Приготування поживних середовищ здійснюється в спеціальних реакторах, обладнаних мішалками. Дозування поживних компонентів підбирається і здійснюється індивідуально на кожному виробництві відповідно до технологічного регламенту конкретного процесу.

27. Відомо, що імунний захист людини може бути посилений певними іммунобіопрепаратами, такими як вакцини, сироватки, рекомбінантні інтерферони, інтерлейкіни. Визначте роль генної інженерії в створенні цих препаратів.

Відповідь: Імунобіотехнології – це розділ сучасної біотехнології, представленої як науковими досягненнями, так і динамічно розвинутим технологічним виробництвом діагностичних, профілактичних і лікарських засобів з застосуванням в якості діючого початку різних агентів і процесів імунної системи.

Існуючі традиційні вакцини, незважаючи на очевидний позитивний ефект їх широкого застосування, мають ряд недоліків. До них відносяться:

наявність небажаних біологічно активних і баластних компонентів в препаратах, неповноцінні імунологічні властивості самих антигенів.

Крім того, існують захворювання, які не викликають імунітету, вакцини проти яких взагалі відсутні і не можуть бути сконструйовані на основі класичних принципів. Все це викликає необхідність вдосконалення вже існуючих вакцин і створення принципово нових типів вакцин. Одним з найбільш перспективних напрямків в даній області є отримання вакцинних препаратів на основі методів генної інженерії.

Останнім досягненням генної інженерії і біотехнології стало створення рекомбінантних противірусних вакцин, що містять гібридні молекули нуклеїнових кислот. Дані вакцини мають цілу низку переваг.

Вони характеризуються відсутністю (або значним зниженням) баластних компонентів, повною нешкідливістю, низькою вартістю, яка пов'язана зі здешевленням промислового виробництва вакцин. Експресований в клітинах вакцинованої тварини білок має конформацію, близьку до нативної, і має високу антигенну активність.

28. Технологія біосинтезу антибіотиків може здійснюватися як поверхневою, так і глибинною ферментацією. Наведіть порівняльну характеристику цих ферментацій з точки зору розвитку промислового способу виробництва антибіотиків і апаратурного оформлення.

Відповідь. Продукенти більшості антибіотиків, в тому числі найважливіших для медичної практики, є аеробами або (рідше) факультативними анаеробами. У зв'язку з цим в перші роки після отримання пеніциліну та інших речовин їх продуценти вирощувались на поверхні рідкого поживного середовища в стаціонарних умовах в мікробіологічних матрасах або колбах, які розміщували в термостатах або термостатних кімнатах. Культура продуцента росла тільки на поверхні середовища.

Цей спосіб був трудомісткий, не економічний і не дозволяв напрацьовувати антибіотик в великих кількостях. Дуже скоро поверхнева ферментація була замінена на глибинну. Через поживне середовище пропускали повітря і середовище безперервно перемішували. Це дозволило використовувати для зростання продуцента весь обсяг середовища. Тільки глибинна ферментація створила можливість сучасного біотехнологічного виробництва з випуском кінцевого продукту у великій кількості.

29. У процесі ферментації рослинних клітин для збільшення виходу цільового продукту (наприклад, шиконіну) було запропоновано значно збільшити температуру до 37°C, об'єм ферментера (більше 2000 л), використовувати трилопатеvu мішалку, збільшити подачу кисню та підвищити вологість середовища з 50% до 60-70%. Визначте, які помилки було допущено при виборі умов ферментації?

Відповідь. В процесі ферментації рослинних клітин для збільшення цільового продукту необхідно дотримуватись певних умов. Оптимальна температура – близько 26°C. Через низьку інтенсивність дихання цих клітин потреба їх в кисні відповідно знижена, і необхідність в забезпеченні даних культур системою інтенсивної аерації відпадає.

У зв'язку з цим при впровадженні технології суспензійного культивування треба підбирати біореактори з об'ємом не більше 20 м³ та з ситемами особливого перемішування (турбінне, висхідний потік повітря і струшування), щоб не зруйнувати клітини. оптимальна вологість для зростання культури – 60-70%

30. Відомо, що з рослини *Digitalis lanata* можна синтезувати як токсичний дигітоксин, так і менш токсичний дигоксин. Чи можливо перетворення дигітоксина в дигоксин за допомогою біотехнології?

Відповідь. Цікава важлива особливість: з диференційованих клітин рослини *Digitalis lanata* можна синтезувати як токсичний дигітоксин, так і менш токсичний дигоксин, тоді як недиференційовані культури клітин *Digitalis lanata* самі по собі не утворюють серцевих глікозидів, але можуть здійснювати реакції біотрансформації дигітоксина в дигоксин.

31. Порівняйте криві зростання мікроорганізмів при отриманні первинних і вторинних метаболітів в біотехнологічному виробництві.

Відповідь. Розрізняють шість основних фаз росту: лаг-фаза (1), фаза прискорення (2), експоненціальна або логарифмічна фаза (3), фаза уповільнення (4), стаціонарна фаза (5), фаза відмирання (6).



Як правило, після інокуляції стерильного культурального середовища миттєвого збільшення числа клітин не спостерігається. Протягом певного періоду часу, званого лаг-фазою, клітини адаптуються до нових умов.

Якщо посівним матеріалом служить культура, яка перебуває в експоненційній фазі, виражена лаг-фаза може бути відсутня і ріст клітин почнеться одразу після інокуляції. Між лаг-фазою і експоненційною фазами є короткий період – фаза прискорення, коли швидкість росту клітин збільшується до досягнення постійної величини. У період експоненційної фази клітини зазнають кілька поділів.

Коли субстрат присутній в надлишку, досягається максимальна швидкість росту культури в експоненційній фазі, синтезуються первинні метаболіти (нуклеотиди, багато ферментів, вітаміни), через велике число клітин в кінці експоненційної фази субстрат витрачається дуже швидко, настає фаза уповільнення, яка може бути короткочасною.

В результаті виснаження лімітуючого субстрату або накопичення продуктів метаболізму, що уповільнюють зростання, збільшення числа клітин поступово припиняється і культура переходить в стаціонарну фазу.

В цей час біомаса залишається постійною, метаболізм зазнає кардинальних змін, синтезуються вторинні метаболіти (антибіотики, пігменти), що представляють комерційний інтерес, наприклад антибіотики. Тривалість стаціонарної фази залежить від конкретного мікроорганізму і умов зростання. У фазі відмирання метаболізм припиняється, так як енергетичні запаси клітин виявляються вичерпаними. При промисловому синтезі, ще до настання фази відмирання, ферментацію зупиняють.

32. У пошуку і створенні найбільш безпечних та ефективних лікарських засобів велика роль відводиться таргетному скринінгу. Поясніть, що таке таргетний скринінг і як він працює?

Відповідь. На прикладі скринінгу антибіотиків. У клініці в даний час використовується близько двохсот природних і синтетичних антибактеріальних речовин. Кожна з них має свою мішень. Як правило, це

або ферменти, або рибосомний білок. Всього реалізованих мішеней також близько двохсот.

Отже, переважна кількість генів в якості мішеней для антибактеріальних агентів все ще не використовується. Для доказів «суттєвості» (необхідність гена для життєдіяльності клітини) генів застосовується метод виборчого «вибивання» гена з генома з перевіркою виживання організму після такої процедури, який представляє великий інтерес як технологія скринінгу речовин.

Традиційно первинний відбір останніх проводиться шляхом випробування їх дії на ріст тест-культури мікроорганізму. Високоактивні речовини, відібрані на цьому етапі, проходять подальші випробування, зокрема визначається антимікробний спектр їх дії і активність в дослідах на лабораторних тваринах, а також токсичність для організму.

По завершенні доклінічних випробувань в разі отримання позитивних результатів ставиться питання про передачу препарату в клініку, потім починається поглиблене вивчення механізму дії антимікробного засобу на субклітинному і молекулярному рівнях, тобто ведеться пошук його внутрішньоклітинної мішені – таргета.

Далі виявляється ген, що кодує утворення цієї макромолекули, або гени, які кодують утворення макромолекул, що входять в макромолекулярний комплекс.

За новою технологією скринінгу використовують інформацію про повністю секвенований геном патогена і наявності в ньому «істотних» генів. У лабораторіях, що працюють над створенням нових антимікробних засобів, попередньо вибирається ген, який буде використаний для їх випробування як таргет.

Таргетний скринінг дозволяє відповідно до вибору гена відбирати біологічно активні речовини з запланованим механізмом дії (на відміну від традиційного, коли пошук йде «від клітини до гену»).

33. У процесі ферментації проаналізуйте загальні закономірності ферментаційного процесу при синтезі антибіотиків.

Відповідь. Продуценти більшості антибіотиків, в тому числі найважливіших для медичної практики, є аеробами або (рідше) факультативними анаеробами. У зв'язку з цим в перші роки після отримання пеніциліна та інших речовин їх продуценти вирощувались на поверхні рідкого поживного середовища в стаціонарних умовах в мікробіологічних

матрасах або колбах, які розміщали у термостатах або термостатних кімнатах. Культура продуцента росла тільки на поверхні середовища.

Цей спосіб був трудомісткий, не економічний і не дозволяв напрацьовувати антибіотик в великих кількостях. Дуже скоро поверхнева ферментація була замінена на глибинну.

Через поживне середовище пропускали повітря і середовище безперервно перемішували. Це дозволило використовувати для зростання продуцента весь об'єм середовища. Тільки глибинна ферментація створила можливість сучасного біотехнологічного виробництва з випуском кінцевого продукту у великій кількості.

Перша фаза розвитку культури продуцента під час ферментаційного процесу названа трофофазою – це фаза збалансованого зростання. Друга – ідіофаза, або фаза незбалансованого зростання. Протягом трофофази антибіотик в культуральній рідині не виявляється або виявляється в незначних кількостях.

Під час ідіофази приріст біомаси сповільнюється. Настає швидке накопичення антибіотика в культуральній рідині. У трофофазі джерела вуглецю і азоту в середовищі швидко споживаються, і кількість їх в середовищі зменшується. В ідіофазі їх споживання сповільнюється, а в кінці ідіофази відбувається частковий лізис густої культури міцелію.

Одночасно в культурі можна виявити і деяку кількість нових ниток молодого міцелію, який знаходиться вже в умовах середовища, збідненого на поживні речовини, і бере участь в біосинтезі антибіотика.

Таким чином, інтенсивному біосинтезу антибіотика сприяє значне зменшення в середовищі джерел вуглецю і азоту, особливо легко засвоюваних. Відбувається дерепресія ферментів синтезу антибіотика. Однак вирощування продуцентів з самого початку ферментації на збіднених середовищах недоцільне, так як незначне накопичення біомаси протягом трофофази веде, в кінцевому рахунку, і до незначного накопиченню антибіотика малою кількістю клітин продуцента.

Для високопродуктивної ферментації необхідно дотримуватися певних умов. Продуценти антибіотиків вирощують на різних середовищах як відносно простого складу, так і складного. Останні отримали назву комплексних середовищ. У них можуть входити соєве або бавовняне борошно, кукурудзяний екстракт та інші природні багатокomпонентні джерела поживних речовин.

Також в середовища вносять індивідуальні органічні сполуки і мінеральні солі. Для кожного штаму-продуценту склад оптимального для біосинтезу антибіотика середовища підбирається окремо. Це стосується

навіть штамів одного виду, які продукують один і той самий антибіотик. Існують і деякі загальні закономірності, що враховуються при роботі з більшістю продуцентів.

Вуглецькатаболітна регуляція є одним з механізмів, що впливають на біосинтез вторинних метаболітів. Відомо, що глюкоза – найкраще джерело вуглецю та енергії для будь-яких організмів. Однак швидкий катаболізм глюкози різко знижує біосинтез антибіотиків.

Показано, що глюкоза послаблює біосинтез бета-лактамів, аміноглікозидів і багатьох інших антибіотиків, утворених різними продуцентами. Відносно біосинтезу антибіотиків відзначимо, що глюкоза, фруктоза, сахароза і галактоза – сильні репресори цього процесу.

Необхідно підкреслити, що продукти катаболізму глюкози пригнічують не активність ферментів біосинтезу антибіотиків, а сам синтез цих ферментів. Повільно утилізовані полісахариди (крохмаль та інші) більш сприятливі для біосинтезу антибіотиків. Не є репресором біосинтезу і лактоза, яка також повільно утилізується: при її гідролізі звільняється глюкоза, що репресує бета-галактозидазу і в результаті гідролізу лактози (поява в середовищі глюкози) сповільнюється.

Високий вміст в середовищі фосфору (у вигляді неорганічних фосфатних солей) несприятливий для біосинтезу більшості антибіотиків. Загальна причина цього – збагачення клітини макроергічними фосфорними сполуками (перш за все АТФ), що підвищує швидкість росту міцелію. Накопичується багато біомаси, але відносно мало антибіотика.

Наприклад, високоактивні штами продуцентів тетрациклінових антибіотиків містять в міцелії менше АТФ і ростуть повільніше, ніж вихідні низькоактивні продуценти тетрациклінів. Несприятливий вплив фосфору на біосинтез бета-лактамічних антибіотиків пояснюється на біохімічному рівні наступним механізмом: утворення LLD-трипептида – ключової сполуки, з якої починається синтез пеніцилінів та цефалоспоринів, інгібується глюкозо-6-фосфатом.

Взаємодія легкозасвоюваного цукру і фосфату дає негативний ефект на біосинтез. Але фосфор не може бути повністю виключений з середовища. Біосинтез антибіотиків знижується при його надмірній кількості, тому треба підбирати оптимальний вміст. Амоній та інші легкоутилізовані джерела азоту, подібно до легкоокислюваних вуглеводів, підсилюють зростання продуцентів бета-лактамічних, полієнових антибіотиків (еритроміцину, рифампіцинів та інших), але негативно впливають на їх біосинтез.

Соєве і бавовняне борошно, БВК (білково-вітамінний концентрат) повільно розщеплюються в процесі ферментації, тобто з них повільно

вивільняються амінокислоти та іони амонію, тому їх використовують в якості компонентів поживних середовищ, що дозволяє отримувати високий вихід антибіотиків. У продуцентів бета-лактамів механізм негативної дії легкозасвоюваних джерел азоту на біосинтез антибіотиків пов'язаний з рівнем глютамінсинтетази в міцелії.

Відомо, що глютамін є донором аміногруп для ряду амінокислот, а самі амінокислоти, в свою чергу, є попередниками бета-лактамічних антибіотиків. Імовірно, що у різних продуцентів механізм цієї дії на біосинтез різний.

У будь-якому випадку несприятливу дію легкозасвоюваних джерел азоту на біосинтез обов'язково враховується при підборі середовищ, а також здійснюється контроль кількості таких сполук.

34. У числі нових лікарських засобів можна розглядати «антисенсні олігонуклеотиди». Поясніть мету їх створення і механізм дії.

Відповідь. Відомо, що деякі захворювання (як спадкові, так і неспадкові) можуть бути пов'язані не з дефіцитом конкретного білка або його дефектом, а, навпаки, з гіперпродукцією нормального функціонального активного білка. Звідси впливає завдання часткового або повного пригнічення продукції такого білка з різною варіабельністю. Інакше кажучи, необхідно вибірково пригнічувати експресію гена, що кодує цей білок, або гена ферменту, який бере участь в посттрансляційній модифікації даного білка і перетворенні його в активну форму.

Відповідно до цього була висунута концепція створення інноваційних лікарських засобів, які отримали загальну назву «антисенсні олігонуклеотиди». Передбачається отримувати комплементарну для ДНК кожного гена (його ділянки) послідовність нуклеотидів, яка за рахунок водневих зв'язків реагуватиме з ДНК гена або з інформаційною РНК, матрицею для якої служить вказана ДНК. У першому випадку пригнічення утворення надлишкового білка при зв'язуванні з геном буде проходити на стадії транскрипції, а в другому (при зв'язуванні з інформаційною РНК) – стадії трансляції.

Специфічність антисенсної послідовності нуклеотидів (вибірковість впливу на обраний ген) досягається при довжині 15-20 нуклеотидів (звідси назва «олігонуклеотиди»).

Для реалізації ідеї використання антисенсних олігонуклеотидів як лікарських засобів повинен бути подоланий ряд труднощів: необхідно вирішити проблему спрямованої доставки їх до клітин-мішеней в організмі

людини, має бути забезпечений захист антисенсних олігонуклеотидів від розщеплюючих їх нуклеаз. Пропонується: модифікація таких нуклеотидів у відповідних лікарських препаратах, що заважає впливу на них нуклеаз, але не перешкоджає реагуванню з ДНК і РНК-мішенню; упаковка цих нуклеотидів в ліпосоми і т.д.

35. Наведіть методи виділення і очищення ферментів в біотехнологічному виробництві.

Відповідь. Виділення і очищення ферментів з культуральної рідини можуть бути пов'язані зі значними труднощами. Багато (якщо не всі) з цих перерахованих недоліків можуть бути істотно зменшені шляхом використання чистих ферментів і, мабуть, при подальших вдосконаленнях методів застосування ферментів вони будуть практично вирішені.

У майбутньому багато традиційних ферментних процесів можуть бути замінені використанням багатоферментних реакторів, які здатні забезпечити високоефективну утилізацію субстратів, обумовити більш високий вихід і набагато кращу однорідність отримуваних продуктів.

Більшість ферментів, що використовуються в промисловості, є позаклітинними ферментами, тобто ферментами, що секретуються мікроорганізмами в зовнішнє середовище. Таким чином, якщо мікроорганізм продукує ферменти для розщеплення великих молекул до асимільованих (низькомолекулярних) форм, то ферменти зазвичай виводяться в навколишнє (культуральне) середовище.

У таких випадках культуральна (ферментаційна) рідина, що отримується при вирощуванні мікроорганізмів (наприклад, дріжджів або міцеліальних грибів, бактерій), є основним джерелом протеаз, амілаз і в дещо меншій мірі целюлаз, ліпаз і інших гідролітичних ферментів.

Багато промислових ферментів, будучи гідролазами, можуть функціонувати без додаткових складних кофакторів; вони легко виділяються (сепаруються від біомаси) без руйнування клітинних стінок продуцентів і добре розчинні у воді.

Але оскільки більшість ферментів мікроорганізмів за своєю природою є внутрішньоклітинними, то найбільший прогрес в біотехнології може очікуватися саме при їх використанні для промислових цілей. Однак в цьому випадку виникає потреба розробки ефективних способів їх виділення і очищення.

36. Як відомо, виробництво вітаміну B_{12} відноситься до чисто біотехнологічного способу його отримання, коли в якості продуцента даного вітаміну використовуються пропіонові бактерії. Запропонуйте оптимальний метод ферментації і умов її проведення.

Відповідь. Вітамін B_{12} (α -5,6-діметилбензімідазол) – цианкобаламін – є гематопоетичним і ростовим фактором для багатьох тварин і мікроорганізмів. Здатність до синтезу даного вітаміну широко поширена серед прокаріотичних мікроорганізмів. Активно продукують вітамін B_{12} *Propionibacterium*, а також *Pseudomonas* і змішані культури метаноутворюючих бактерій.

Отримання вітаміну на основі пропіоновокислих бактерій, здатних до самостійного синтезу аденозилкобаламіну 5,6 ДМБ (коензиму B_{12}), здійснюється в дві стадії в двох послідовних апаратах об'ємом 500 л. Першу стадію культивування проводять протягом 80 год при слабкому перемішуванні в анаеробних умовах до повної утилізації цукру; отриману біомасу центрифугують. Згущену суспензію інкубують у другому апараті ще протягом 88 год, аеруючи культуру повітрям ($2 \text{ м}^3/\text{год}$).

Середовище містить цукри (глюкозу 1-10%), добавки солей заліза, марганцю, магнію і кобальту (10-100 мг/л), кукурудзяний екстракт (3-7%). Як джерела азоту прийнятий $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ферментацію проводять при 30°C , рН стабілізують на рівні 6,5-7,0 підтітровою культурою розчином NH_4OH . На другій стадії відбувається утворення ДМБ.

Після завершення ферментації вітамін екстрагують з клітин нагріванням протягом 10-30 хвилин при $80-120^\circ\text{C}$. При подальшій обробці гарячої клітинної суспензії ціанідом відбувається утворення CN-кобаламіну; продукт сорбують, пропускаючи розчин через активоване вугілля і оксиди алюмінію; потім елюїрують водним спиртом або хлороформом.

Після випарювання розчинника отримують кристалічний вітамін. Активними продуцентами B_{12} є бактерії роду *Pseudomonas*. Розроблено ефективні технології на основі термофільних бацил *Bacillus circulans*, протягом 18 год при $65-75^\circ\text{C}$ в нестерильних умовах. Бактерії вирощують на багатих середовищах, приготованих на основі соєвого та рибного борошна, м'ясного і кукурудзяного екстракту.

37. Наведіть класифікацію механізмів резистентності до антибіотиків і виділіть найбільш небезпечну.

Відповідь. Виділяють наступні механізми резистентності антибіотиків:

1. Зміна конформації внутрішньоклітинної мішені для даного антибіотика. Антимікробний агент проникає в клітину, але його мішень (транспептидаза пептидоглікана, рибосома, ДНК-гіраза) його не зв'язує і пригнічення метаболізму не відбувається.
2. Зменшення проникності оболонки мікробної клітини для антибіотика. Антибіотик хоча і проникає в клітину, але в незначних кількостях.
3. Поява в оболонці клітини системи активного «викидання» антибіотика, що проникає в клітину, внаслідок чого його внутрішньоклітинна концентрація не може ставати високою.
4. Ферментативна інактивація антибіотика захисними ферментами (найбільш серйозний тип захисту мікробної клітини).

Формування в бактеріальній клітині зазначених захисних механізмів обумовлено появою генів резистентності не тільки в хромосомі. Велику увагу привертають і позахромосомні (плазмідні) генетичні елементи мікробної клітини – кільцеві молекули ДНК, що мають розмір в сотні разів менший, ніж хромосома. Плазміди, що несуть гени резистентності до антибіотиків – R-плазміди.

Основна небезпека плазмідної резистентності в генетичному плані полягає в тому, що плазміди передаються з клітини в клітину кон'югацією (аналог статевого процесу) – без поділу клітини, однак плазміда при цьому реплікується.

Таким чином, одна клітина може швидко передати резистентність великій кількості клітин – виник навіть термін «інфекційна резистентність». Плазмідна резистентність рідко зустрічається лише в разі першого з перелічених вище механізмів резистентності, для даного механізму характерні спонтанні мутації в структурному гені. Який визначає структуру тієї мішені-макромолекули, з якою зв'язується антибіотик.

Внаслідок таких мутацій змінюється амінокислотна послідовність в ферменті або в рибосомні білку, що веде і до зміни конформації молекули, що перестає зв'язувати антибіотик.

38. Після встановлення механізмів ферментативної інактивації аміноглікозидних антибіотиків резистентними до них бактеріями була здійснена цілеспрямована трансформація аміноглікозидів з метою зробити їх «нечутливими» до інактивуючих ферментів. Представте таку трансформацію аміноглікозидних антибіотиків (на прикладі створення амікацину) як поєднання біосинтезу і оргсинтезу.

Відповідь. Після встановлення механізмів ферментативної інактивації аміноглікозидних антибіотиків резистентними до них бактеріями почалися спроби цілеспрямованої трансформації молекул аміноглікозидів з метою зробити їх стійкими до ферментів.

Так, в молекулі канаміцину група в першому положенні в аміноциклітольному фрагменті молекули була заміщена залишком L-аміно- α -оксималярної кислоти. Це призвело до загальної зміни конформації природної молекули, при збереженні у неї майже всіх функціональних груп. Збереглася антибактеріальна активність, але була в той же час втрачена «чутливість» до всіх ферментів, поширених серед резистентних мікроорганізмів, що інактивують аміноглікозиди. Отримане похідне, назване амікацином, виявилось високоефективним.

39. Факти свідчать, що позбутися генів резистентності повністю неможливо, а це значно послаблює позиції антибактеріальних препаратів в лікуванні різних інфекційних захворювань. Що таке гени резистентності? Які організаційні заходи можна запропонувати в боротьбі з антибіотикорезистентністю?

Відповідь. Формування в бактеріальній клітині захисних від антимікробних препаратів механізмів обумовлене появою генів резистентності хромосомної і позахромосомної локалізації. Велику увагу привертають позахромосомні (плазмідні) генетичні елементи мікробної клітини.

Плазміди, що несуть гени резистентності до антибіотиків – R-плазміди. Основна небезпека плазмідної резистентності в генетичному плані полягає в тому, що плазміди передаються з клітини в клітину кон'югацією (аналог статевого процесу) – без поділу клітини, однак плазміда при цьому реплікується. Таким чином, одна клітина може швидко передати резистентність великій кількості клітин – виник навіть термін «інфекційна резистентність».

Так, позбутися від генів резистентності повністю неможливо, але можна частоту їх розподілу мінімізувати. Вилучення антибіотика з клінічної практики означатиме зменшення поширеності генів резистентності до нього. Через певний час (від року до декількох років) і близькі до нього препарати відновлять свою ефективність і можуть бути повернуті в лікувальну практику.

Загальна стратегія в боротьбі з антибіотикорезистентністю може полягати в послідовній заміні одних препаратів іншими з поверненням

«старих» препаратів в практику через певний термін. Така циклічність швидше призведе до бажаних результатів, якщо її будуть дотримуватися в великих географічних регіонах.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, какальтернатива органического синтеза / А.М. Безбородов - М.: Агропромиздат, 1991. – 238 с.
2. Бекер М.Е. Биотехнология / Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П.– М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
3. Биотехнология микробных ферментов / [Лобанок А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В., Безбородов А.М.] – Минск: Наука и техника, 1989. – 204 с.
4. Биотехнология. Принципы и применение / [Бич Г., Бест Д., Брайерли К. и др.] Пер. с англ. ; под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
5. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / Бирюков В. В. — М.: КолосС, 2004. — 296 с.
6. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: учеб.пособие / Воробьева Л.И. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
7. Диланян З.Х. Сыроделие/ З.Х. Диланян - М.: Легкая и пищевая промсть,1984. – 280 с.
8. Егоров Н.С. Биотехнология: микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов: учеб. пособие для вузов / Н.С. Егоров, В.Д. Самуилов. - М.: Высшая школа, 1997. – 143 с. – (в 8 кн., кн.6).
9. Машины и аппараты пищевых производств: учебник для вузов/ [Антипов С.Т., Кретов И.Т., Остриков А.Н. и др.]; под ред. В.А. Панфилова. - М.: Высшая школа, 2001. - 704 с. – (в 2 кн., кн.1).
- 10.Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
- 11.Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник / Пирог Т.П. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.
- 12.Промышленная микробиология: учеб. пособие для вузов / [Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н. и др.]; под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 688 с.
- 13.Сельскохозяйственная биотехнология / [Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др.]; под ред. В.С.Шевелухи. – [3- е изд., перераб. и доп.] – М.: Высшая школа, 2008. – 710 с.

14. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты: учебник для студентов высших учебных заведений/ С.А.Гудков и др. под ред.С.А. Гудкова – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800с
15. Капрельянц Л.В. Ферменты в пищевых технологиях. – Одесса: 2009. – 468с.
15. Капрельянц Л.В. і ін. Мікробіологія харчових виробництв. Навчальний посібник. – Херсон: ФОП Гринь Д.С., 2016. – 478с.
16. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник – К.: Вид-во Ліра-К, 2019. – 258с.
17. Капрельянц Л.В. і ін.. Технічна мікробіологія. – Одеса: Друк, 2006. – 308с.
18. Технічна мікробіологія. Лабораторний практикум.- Одеса: Симекс-принт, 2012. – 144с.
19. Келети Т. Основы ферментативной кинетики: пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 350 с.
20. Божков. А.И.Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков.:Федорко, 2008. – 363 с.
21. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии: пер. с англ. В 2-х частях. Ч.1. – М.: Мир, 1989. – 692 с.
22. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии: пер. с англ. В 2-х частях. Ч.2. – М.: Мир, 1989. – 590 с.
23. Грегірчак Н.М., Антонюк М.М., Буценко Л.М. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології: Навч. Посіб. – К.: НУХТ, 2015. – 276 с.
24. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. – СПб.: изд.фирма »Наука», 1995. – 600.
- 25 Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія : Підручник. — К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
- 26.. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробіологічного синтезу: підручник – К.: Видавництво Ліра-К, 2019. – 258с
27. Капрельянц Л.В Биохимия с основами физиологии питания.-Херсон:ФРП Гринь Д.С., 2017. – 250с.
28. Січняк О.Л.,Капрельянц Л.В., Килименчук О.О. Генетика. Навчальний посібник. – Херсон: Олді-Плюс, 2018. – 148с.
29. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П., Величко Т.А. Інженерна ензимологія.- Одеса, ОНАХТ, 2018. – 72с.
30. Капрельянц Л.В Пребиотики: химия, технология, применение, 2015.- 252с.
- 31.Капрельянц Л.В. и др..Технічна мікробіологія. Лабораторний практикум. – Одеса: Сімекс-прінт,2012. -144с.
- 32.Безбородов А.М., Квеситадзе Г.И. Микробиологический синтез. Санкт Петербург: Проспект Науки. 2011. – 144с.

