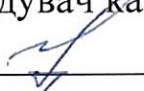


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

МЕТОДИЧНА РОЗРОБКА ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Семінарське заняття №6 Тема: **«Фармацевтична біотехнологія отримання амінокислот.»**

для аспірантів

Практичне заняття розробив:
асистент



_____ (Акішева А.С.)

підпис

Практичне заняття обговорено на
методичній нараді кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: Фармацевтична біотехнологія отримання амінокислот.

Мета: Ознайомитися з основними напрямки розвитку біотехнології амінокислот, принципи отримання. Використання амінокислот в фармацевтичній галузі.

Основні поняття: амінокислота, L-аскорбінової кислоти

Обладнання: згідно до вимог Належної аптечної практики (GPP).

Навчальний час: 4,0

План

I. Організаційний момент

Зміст теми.

Амінокислоти широко застосовують в медицині для терапії післяопераційних хворих, при лікуванні захворювань ЦНС, виразковій хворобі шлунка і дванадцятипалої кишки, печінки (серотонін, аспарагін, валін, гістидин, гліцин, глутамін і глутамінова кислота, ізолейцин, лейцин, метіонін, пролін, тирозин, триптофан , фенілаланін, цистеїн). У харчовій промисловості в якості підсилювачів смаку і аромату, антиоксидантів і харчових добавок (аланін, аспарагінова кислота, гліцин, глутамінова кислота, лізин, цистеїн); в сільському господарстві - в якості кормових добавок (лізин, треонін); в хімічній промисловості - як вихідні речовини при синтезі полімерів і виробництві косметичних засобів.

Щорічно в світі виробляється більше 800000 тонн амінокислот вартістю понад 5 млрд. Доларів; при цьому більше половини загального обсягу виробництва припадає на частку L-глутамінової кислоти, яку використовують для отримання широко відомого підсилювача смаку та аромату - натрію глутамату.

У промисловому масштабі амінокислоти отримують, в основному, екстракцією з білкових гідролізатів або очищенням продуктів метаболізму двох неспоруючих грамположитивних ґрунтових бактерій - *Corynebacterium* або *Brevi bacterium* spp. Зазвичай для підвищення продуктивності цих мікроорганізмів використовують мутагенез з подальшим відбором штамів - надпродуцентів певних амінокислот, але такий спосіб отримання штамів вимагає багато часу і ефективність його невелика. Альтернативні підходи - виділення та зміну специфічних генів, що кодують ключові ферменти певних біохімічних реакцій. Наприклад, генно-інженерний спосіб отримання амінокислоти триптофану, що синтезується *S. glutamicum*, одного з видів *Corynebacterium*. Для цього в клітини *S. glutamicum* дикого типу введена копія гена, що кодує антранілатсинтазу, ферменту, що лімітує синтез триптофану.

Високий рівень біосинтезу триптофану досягають введенням в клітини *S. glutamicum* модифікованих генів трьох ключових ферментів: 3-дезоксид-

арабіногептулозонат-7-фосфатсінтази, антранілатсінтази і антранілатфосфорібозілтрансферази. В якості альтернативи для синтезу амінокислот можна використовувати *E. coli*.

Відомо, що важливим регулятором функцій клітин, тканин і органів, здійснюваних через рідкі, середовища організму, є $\alpha 2$ - макроглобулін (МГ). Цей білок здатний пригнічувати активність протеолітичних ферментів, транспортувати цитокіни, регулювати процеси ендоцитозу, кооперації різних клітин крові, презентировають мікроорганізми і гени. З плазми крові людини очищенням $\alpha 2$ - макроглобуліну, що поєднує дробове осадження поліетиленгліколем, аніонообмінної і металхелатної афінної хроматографією, отриманий нативний білок, який має унікальні регуляторні властивості - високу інгибіруючу активність щодо протеїназ, препарат (НВО «Вектор», Новокузнецький ГІУВ) показаний при запальних процесах, передозуваннях протеїназ, септичних станах, викликаних мікроорганізмами. На основі нативного $\alpha 2$ - макроглобуліну отримані стабільні комплекси, які мають повну біологічну сумісність з плазміном і інтерфероном α -ІФ2. Доставка комплексу $\alpha 2$ -МГ-ІФ2 безпосередньо в пухлину досить перспективна в онкології.

Природні пептиди будь-якого походження універсальні, вони надають захисну дію на організм, стимулюючи роботу імунної системи. Цінною сировиною для отримання поліпептидів є гідробіонти. Першим препаратом гідробіонтів був ганглін, отриманий в 1981 р.р. НВО «Біомед» з гангліїв тихоокеанських кальмарів методом ультрафільтраційного очищення і виділення пептидів. Ганглін містить 45 пептидних фракцій. Імуномодулюючі властивості гангліна визначили його застосування для усунення будь-яких вторинних імунодефіцитів. Препарат чинить регулюючий вплив на реакції клітинного і гуморального ланок імунітету і неспецифічну резистентність організму, посилює функціональну активність ПМЯЛ і макрофагів, стимулює утворення, диференціювання і функціональну активність Т-лімфоцитів, синтез специфічних антитіл в сироватці крові, зменшує розвиток аутоімунних процесів, володіє антигістамінними, Антисеротонінові, протизапальними властивостями.

Ганглін зареєстрований в якості харчової добавки для ветеринарії, коригуючої імунодефіцити і надає позитивний вплив на гомопоез.

Препарат гідробіонтів - Молокіні - отриманий з молочка лососевих риб; поряд з імунорегулюючих активність має гонадотропними властивостями.

Препарат Верміна (НВО «Біомед») являє собою очищену, стерильну, лиофільно висушену суміш білків і пептидів, екстрагованих з гомогенату черв'яків *Eisenia foetida*; препарат нетоксичний, не виявляє мутагенної активності, володіє ферментативної активністю оксидоредуктаз, трансфераз та гідролаз, має імуномодулюючу дію. Мазь на основі Верміна запропонована для лікування тривало не загоюються гнійних ран.

Синтез L-аскорбінової кислоти

В даний час для великомасштабного виробництва L-аскорбінової кислоти (вітаміну С) використовують переважно трудомісткий процес, що включає одну мікробіологічну стадію і кілька хімічних. Вихідним субстратом для нього є D-глюкоза (рис. 1). На останньому етапі цього процесу 2-кетоглуконової кислота (2 KLG) перетворюється в кислих умовах в L-аскорбінову кислоту.

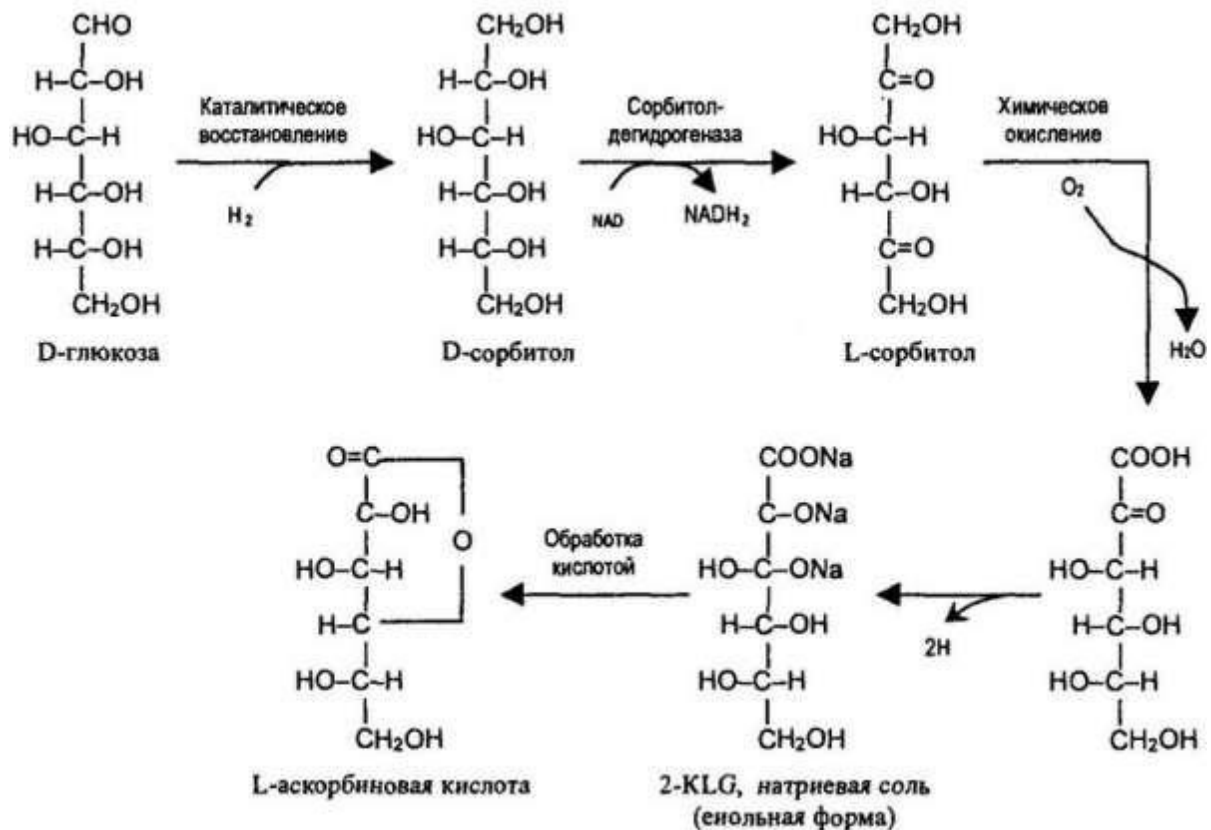


Рис 1 Промисловий синтез L-аскорбінової кислоти. Стадії перетворення L-сорбітолу в L-сорбозу здійснюється за участю бактерії, яка синтезує фермент сорбітолдегідрогеназа. Решта стадії - чисто хімічні реакції (по Б. Глінку, Дж. Пастернаку).

II. Контроль опорних знань

1. Наука, яка на основі застосування знань у галузі мікробіології, біохімії, генетики, генної інженерії, імунології, хімічної технології, приладо- і машинобудування використовує біологічні об'єкти або молекули для промислового виробництва корисних для людини і тварин речовин і продуктів - це ...

- а) біотехнологія;
- б) анатомія;
- в) морфологія;

- г) систематика;
 - д) екологія.
- 2) Об'єктами біотехнології є ...
- а) віруси, бактерії, гриби, протозойні організми, клітини (тканини) рослин, тварин і людини, речовини біологічного походження, молекули;
 - б) рослини і їх тканини і органи;
 - в) мікроорганізми і продукти їх життєдіяльності;
 - г) новітні технології (нанотехнології);
 - д) весь світ.
- 3) Рівні, на яких проводяться дослідження в біотехнології рослин ...
- а) клітинний і молекулярний;
 - б) молекулярний і атомарний;
 - в) клітинний і тканинний;
 - г) нано рівень;
 - д) мікрорівень.
- 4) рекомбінантов - це ...
- а) організми, отримані методами генетичної інженерії;
 - б) видозміни хромосом;
 - в) гени, отримані методами генетичної інженерії;
 - г) різновид природної мутації;
 - д) каліцтва.
- 5) Процес штучного створення біологічного об'єкта - це ...
- а) зміна його генетичної інформації з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості;
 - б) зміна його зовнішнього вигляду з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості;
 - в) зміна його генетичної інформації з метою створення нових організмів;
 - г) зміна його працездатності з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості;
 - д) зміна його фізіологічних функцій з метою виключити небажані і посилити потрібні властивості або надати йому абсолютно нові якості.
- б) Одне з головних напрямків біотехнології -
- а) виробництво біологічно активних сполук, лікарських препаратів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;
 - б) застосування біологічних методів боротьби із забрудненням рослин;
 - в) виробництво мікроорганізмів і культивованих еукаріотів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;
 - г) створення нових непотрібних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин і т. п. ;
 - д) створення універсального воїна.

- 7) Одне з головних напрямків біотехнології -
- а) застосування біологічних методів захисту рослин від шкідників і хвороб;
 - б) застосування біологічних методів боротьби із забрудненням рослин;
 - в) виробництво мікроорганізмів і культивованих еукаріотів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;
 - г) створення нових непотрібних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин і т. п. ;
 - д) створення універсального воїна.
- 8) Одне з головних напрямків біотехнології -
- а) створення нових корисних сортів рослин;
 - б) застосування біологічних методів боротьби із забрудненням рослин;
 - в) виробництво мікроорганізмів і культивованих еукаріотів, а також білків, амінокислот, які використовуються в якості кормових добавок;
 - г) створення нових непотрібних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин і т. п. ;
 - д) створення універсального воїна.
- 9) Біотехнологія рослин заснована на ...
- а) використання культивованих *in vitro* клітин рослин;
 - б) використанні культивованих *in vitro* клітин тварин;
 - в) використанні культивованих *in vitro* клітин мікроорганізмів;
 - г) створенні нових сортів рослин;
 - д) створення універсального рослини.
- 10) Чому для створення клітинних технологій використовують культивовані клітини рослин?
- а) вони зберігають здатність синтезувати вторинні метаболіти;
 - б) вони здатні синтезувати нові речовини;
 - в) вони набувають здатність синтезувати нові речовини;
 - г) вони добре регенірують;
 - д) вони здатні вижити в таких умовах.
- 11) Тотипотентність - це ...
- а) особливість культивованих клітин регенерувати *in vitro* цілу рослину;
 - б) вони здатні синтезувати нові речовини;
 - в) вони набувають здатність синтезувати нові речовини;
 - г) вони добре регенірують;
 - д) вони здатні вижити в таких умовах.
- 12) Сфера застосування культури клітин рослин -

- а) службовці моделлю при вивченні метаболізму і його регуляції в клітинах і тканинах рослини;
- б) об'єкти біотехнології;
- в) службовців моделлю при вивченні регуляції метаболізму в клітинах, тканинах і органах рослини;
- г) для отримання нових нестійких рослин;
- д) біотехнологія.

13) Сфера застосування культури клітин рослин -

- а) для отримання нових рослин, здатних до зростання і розмноження;
- б) об'єкти біотехнології;
- в) службовців моделлю при вивченні регуляції метаболізму в клітинах, тканинах і органах рослини;
- г) для отримання нових нестійких рослин;
- д) біотехнологія.

14) Один з напрямків створення нових технологій на основі культивованих тканин і клітин рослин -

- а) отримання БАР рослинного походження;
- б) отримання БАР мікробного походження;
- в) клональное мікророзмноження тварин;
- г) отримання безвірусних грибів;
- д) генетична трансформація на органному рівні.

15) Один з напрямків створення нових технологій на основі культивованих тканин і клітин рослин -

- а) отримання безвірусних рослин;
- б) отримання БАР мікробного походження;
- в) клональное мікророзмноження тварин;
- г) отримання безвірусних грибів;
- д) генетична трансформація на органному рівні.

16) Один з напрямків створення нових технологій на основі культивованих тканин і клітин рослин -

- а) отримання безвірусних рослин;
- б) отримання БАР мікробного походження;
- в) клональное мікророзмноження тварин;
- г) отримання безвірусних грибів;
- д) генетична трансформація на органному рівні.

17) Властивість тотіпотентності рослинної клітини лежить в основі отримання

- а) рослин-регенерантів;

- б) БАВ мікробного походження;
- в) біологічно активних речовин;
- г) безвірусних грибів;
- д) генетичної трансформації на органному рівні.

18) Вперше успішне культивування рослинних тканин на синтетичних живильних середовищах здійснили -

- а) Уайт і Готра (Готьє);
- б) Роббінс і Коте;
- в) Хеллер і Нич;
- г) Мендель і Ломоносов;
- д) Місаровіч і Пастель.

19) Основоположник методу отримання ізольованих протопластів -

- а) Е. Коккінг;
- б) Уайт;
- в) Хеллер;
- г) Мендель;
- д) Місаровіч.

20) Новий метод вегетативного розмноження -

- а) клональне мікророзмноження;
- б) регенерація;
- в) мейоз;
- г) мітоз;
- д) амитоз.

21) Розмістіть в правильному порядку етапи клонального мікророзмноження -

- 1) власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості меристематических клонів;
 - 2) вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка їх до реалізації або посадці в поле;
 - 3) укорінення розмножених пагонів з наступною адаптацією їх до ґрунтових умов, а при необхідності депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+ 2оС, + 10оС);
 - 4) вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання добре зростаючої стерильною культури;
- а) гавб;
 - б) абвг;
 - в) БАГВ;
 - г) гвба;
 - д) агвб.

22) На першому етапі клонального мікророзмноження живильне середовище повинна -

- а) містити антибіотики;
- б) містити вітаміни;
- в) містити фітогормони;
- г) містити бактерії;
- д) утримувати БАВ.

23) Зняти інгібування росту інплантанта можна додавши в живильне середовище -

- а) антиоксиданти;
- б) містити вітаміни;
- в) містити фітогормони;
- г) містити бактерії;
- д) утримувати БАВ.

24) Як додають антиоксиданти в живильне середовище?

- а) омивкой експлантов слабким його розчином протягом 4-24 год;
- б) омивкой експлантов слабким розчином перекису водню протягом 4-24 год;
- в) безпосереднім додаванням в живильне середовище перекису водню;
- г) додаванням в живильне середовище перекису водню і антиоксиданту;
- д) безпосереднім додаванням в живильне середовище і перемішуванням.

25) У якості антиоксидантів можна використовувати:

- а) аскорбінову кислоту, глутатіон, дітіотріетол, діетілдітіокарбомат, полівінілпіролідон;
- б) феноли, терпени та інші вторинні сполуки;
- в) ауксини, цитокініни;
- г) деревне активоване вугілля;
- д) вітаміни, стимулятори росту, фітогормони, вторинні метаболіти, антибіотики.

26) Тривалість першого етапу -

- а) від 1 до 2 місяців;
- б) від 1 до 2 років;
- в) від 1 до 2 днів;
- г) від 1 до 2 тижнів;
- д) місяць.

27) Результат першого етапу -

- а) спостерігається зростання меристематичних тканин і формування первинних пагонів;

- б) спостерігається зростання, розподіл і диференціація меристематичних тканин і формування первинних органів;
- в) утворюються рослини-мутанти;
- г) спостерігається регенерація;
- д) утворюються заростки.

28) На другому етапі клонального мікророзмноження для живильного середовища важливо -

- а) співвідношення цитокинінів і ауксинів;
- б) вміст вітамінів;
- в) співвідношення фітогормонів і вітамінів;
- г) вміст антибіотиків;
- д) вміст БАР.

29) На другому етапі клонального мікророзмноження зміст яких речовин в живильному середовищі більше:

- а) БАП більше, ніж ІУК і НУК;
- б) БАП більше, ніж ІУК;
- в) БАП більше, ніж НУК;
- г) ІУК більше, ніж БАП і НУК;
- д) НУК більше, ніж ІУК і БАП.

30) До чого призводить підвищений вміст цитокинінів в живильному середовищі (5-10 мг / л) -

- а) до формування рослин із зміненою морфологією;
- б) до розвитку рослин-гігантів;
- в) до розвитку рослин-карликів;
- г) формування рослин із зміненою анатомією;
- д) формування рослин з довільно зміненою спадковістю.

31) Укоренение мікропобегов проводять -

- а) витримкою мікропобегов протягом декількох годин в стерильному концентрованому розчині ауксина і подальшому їх культивуванні;
- б) витримкою мікропобегов протягом декількох годин в стерильній живильному середовищі і подальшому їх культивуванням;
- в) безпосереднє культивування рослин на живильному середовищі, що містить ауксини;
- г) посадкою рослин в ґрунт;
- д) посадкою клонів в ґрунт.

32) Укоренение мікропобегов проводять -

- а) безпосереднє культивування мікропобегов на живильному середовищі, що містить ауксини;

- б) витримкою мікропобегов протягом декількох годин в стерильній живильному середовищі і подальшому їх культивуванням;
- в) безпосереднє культивування рослин на живильному середовищі, що містить ауксини;
- г) посадкою рослин в ґрунт;
- д) посадкою клонів в ґрунт.

33) Каллус - це ...

- а) освітня тканину, розташована в місцях поранення рослини;
- б) освітня тканину, розташована в апексі рослини;
- в) меристема, розташована на верхівці втечі;
- г) меристематичних тканину, розташована на кінчику кореня;
- д) тканину рослини.

34) Каллус може виникнути і в результаті ...

- а) через порушення гормонального балансу;
- б) поранення рослини;
- в) зрізу втечі;
- г) лісозаготівель;
- д) порушення росту рослини.

35) Для отримання культивованих калусних клітин необхідна живильне середовище, яку воно містить -

- а) ауксини;
- б) цитокініни;
- в) вітаміни;
- г) антибіотики;
- д) гормони.

36) Процеси, що відбуваються при дедиференціровка -

- а) тканини втрачають характерну їм структуру і повертаються до стану клітин, які діляться;
- б) тканини набувають характерну для них структуру;
- в) тканини повертаються до стану покривних клітин;
- г) тканини повертаються до стану неделящихся клітин;
- д) тканини повертаються до стану проводять клітин.

37) Причина гетерогенності калусних клітин -

- а) різне тканинне походження калусних клітин;
- б) різне меристематическіе походження калусних клітин;
- в) тканини гетерогенні спочатку;
- г) калусних клітини гетерогенних спочатку;
- д) калусних клітини гомогенні.

38) Де здійснюється поверхностне культивування?

- а) на полужидкой агаризованому середовищі;
- б) в чашках Петрі;
- в) в пробірках;
- г) в термостаті;
- д) в колбах.

III. Обговорення теоретичних питань:

1. Методи отримання амінокислот
2. Механізм регуляції біосинтезу амінокислот.
3. Біосинтез лізину. біосинтез треонина
4. Особливості культивування штамів-продуцентів
5. Особливості живильного середовища
6. Умови ферментації амінокислот
7. Прімененіє генної інженерії
8. Контроль якості амінокислот
9. Хроматографія (тонкошарова хроматографія ТШХ ваналізеамінокіслот).

Теми доповідей/ рефератів

1. Методи отримання амінокислот
2. Біосинтез лізину. біосинтез треонина
3. Умови ферментації амінокислот
4. Особливості живильного середовища
5. Механізм регуляції біосинтезу амінокислот.

IV. Підведення підсумків

6. Список рекомендованої літератури

1. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
2. С. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
3. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
4. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
5. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1. –

ОНМедУ, кафедра Технології ліків Семінарське заняття №6. «Фармацевтична біотехнологія отримання амінокислот.»

Методична розробка практичного заняття, ОПП «Фармація, промислова фармація», для докторів філософії III освітньо-наукового рівня, фармацевтичний факультет, Дисципліна: «Фармацевтична біотехнологія» стр. 13