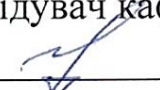


**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

“ 27 ” серпня 2021 р

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
з самостійної роботи студентів (СРС)**

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Тема №4 **«Фармацевтична біотехнологія отримання амінокислот вітамінів та коферментів.»**

для аспірантів

Методичні рекомендації з СРС
розробив:
асистент



(Акішева А.С.)

підпис

Методичні рекомендації з СРС
обговорено на методичній нараді
кафедри
«27» серпня 2021 р.
Протокол № 1

Одеса – 2021

Тема: «Фармацевтична біотехнологія отримання амінокислот вітамінів та коферментів.»

Мета: формування знань студентів щодо організації біотехнологічної лабораторії, принципи і методи мікроклонального розмноження рослин; вміти готувати стерильні живильні середовища, мати уявлення про культивування рослинного матеріалу «in vitro».

Основні поняття: амінокислоти, вітаміни, коферменти.

План

I. Теоретичні питання до заняття:

Біохімічні дослідження метаболізму різних мікроорганізмів показали, що 2-KLG можна отримати, включаючи спільне культивування мікроорганізмів *Corynebacterium* і *Erwinia herbicola* для перетворення глюкози в 2-KLG. Однак умови культивування, оптимальні для одного організму, неприйнятні для іншого, наслідком чого стане спонтанне «вимивання» з середовища одного з них. У подібних випадках можна культивувати мікроорганізми послідовно, але такий процес важко зробити безперервним, так як для зростання мікроорганізмів необхідні істотно різні середовища.

Найбільш простий спосіб - створення одного мікроорганізму, здатного перетворювати D-глюкозу в 2-KLG, полягає у виділенні гена 2,5-DKG-редуктази *Corynebacterium* і введенні його в *Erwinia herbicola*.

Трансформовані клітини *Erwinia herbicola* активно перетворюють D-глюкозу безпосередньо в 2-KLG. При цьому власні ферменти *Erwinia herbicola*, локалізовані у внутрішній мембрані бактеріальної клітини, перетворюють глюкозу в 2,5-DKG (2,5-дікетоглюканова кислота), а 2,5-DKG-редуктазою, локалізована в цитоплазмі, каталізує процес перетворення 2,5-DKG в 2-KLG.

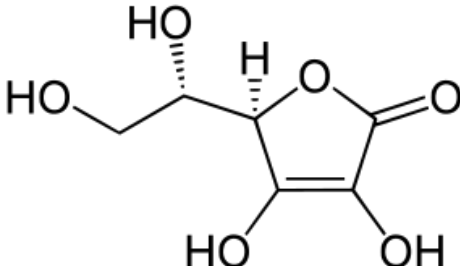
Отже, за допомогою генетичних маніпуляцій вдалося в одному організмі здійснити метаболічні реакції, що протікають в таких різних мікроорганізмах. Цей гібрид набув здатності синтезувати кінцевий продукт комбінованого метаболічного шляху. Такий організм використовується як фабрика для виробництва 2-KLG, що замінює три стадії в тому процесі отримання L-аскорбінової кислоти, який домінує і в даний час.

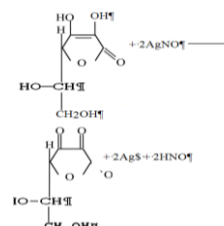
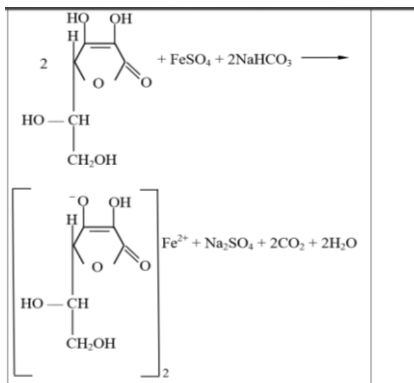
ВІТАМІН С

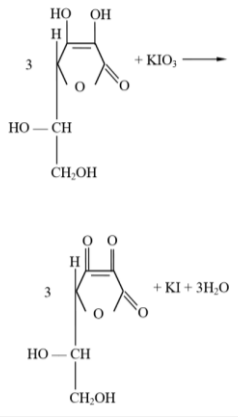
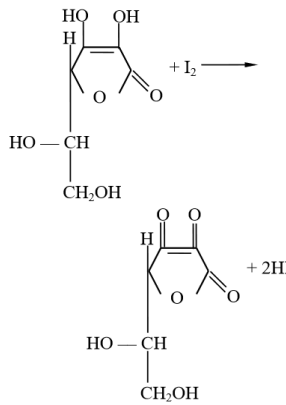
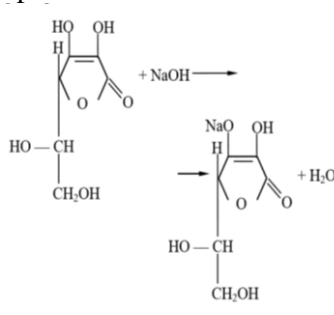
(Аскорбінова кислота)

Це широко поширений в природі вітамін аліфатичного ряду $C_6H_8O_6$ (М.М. - 176,1). Найбільш важливими його джерелами для людини служать продукти рослинного походження: овочі та фрукти. Багато вітаміну С знаходиться в перці, салаті, капусті, хроні, горобині, смородині і особливо в цитрусових. З нехарчових джерел багаті вітаміном С шипшина, хвоя і ін. Вітамін С захищає людину від розвитку цинги. У людини при нестачі вітаміну С відзначається схуднення, загальна слабкість, задишка, біль у

серці, серцебиття. Однією з важливих фізіологічних функцій вітаміну С є співучасть у синтезі колагену і проколагену; нормалізація проникності капілярів. Організм людини не здатний синтезувати вітамін С. Вітамін С виконує біологічні функції відновлення і коферменту деяких метаболічних процесів, є антиоксидантом. Біологічно активний тільки один з ізомерів - L-аскорбінова кислота, який і називають вітаміном С.

<p>Структурна формула</p>	
<p>виробництво</p>	<p>Синтез вітаміну С є багатоступеневим процесом, в якому тільки одна стадія перед- ставлена біотрансформацією. Ця стадія транс- формації d-сорбіту в L-сорбозу за участю ацетатних бактерій. Для отримання L-сорбози використовують глибинну ферментацію, коли культуру продуцента <i>Gluconobacter oxydans</i> вирощують в ферментерах з виходом L-сорбози до 98% початкової кількості сорбіту в середовищі. В даний час широке використання біотехнологічних процесів дозволяє удосконалювати синтез вітаміну С шляхом скорочення багатоетапних і дорогих хімічних стадій. Наприклад, синтез аскорбінової кислоти здійснюється енолізацією його найважливішого проміжного продукту - 2-кето-L-гулонової кислоти, яка в кислих умовах перетворюється L-аскорбінову кислоту. 2-кето-L-гулонової кислоту (2-KLG) отримують методом двостадійного мікробіологічного синтезу, що складається з окислення d-глюкози в 2,5 дикето-D-глюконову кислоту-2,5-DKG (під дією <i>Acetobacter</i>, <i>Gluconobacter</i> або мутантного штаму <i>Erwinia punctata</i>) і біотрансформації останньої (під дією <i>Corynebacterium</i>, <i>Brevibacterium</i>, <i>Arthrobacter</i>, що синтезують фермент 2,5-DKG-редуктазу) в 2-кето-L-гулонової кислоту. При використанні цих мікроорганізмів вихід цільового продукту становить близько 90% від початкової кількості глюкози.</p>
<p>властивості</p>	<p>Вітамін С - кристалічний порошок білого або майже білого кольору без запаху, кислий на смак. Легко розчинний у воді і в 96% спирті, практично не розчиняється в ефірі.</p>
	<p>1. Питоме обертання від + 20,5° до + 21,5° (10% розчин в H₂O). 2. рН повинен бути від 2,1 до 2,6 (5,0% розчин в H₂O).</p>

<p>ідентифікація</p>	<p>3. Інфрачервоний спектр поглинання субстанції повинен відповідати спектру ФСО кислоти аскорбінової.</p> <p>4. Питома показник поглинання при довжині хвилі 243 нм повинен бути від 545 до 585. (До 10 мл розчину соляної кислоти додають 1 мл розчину вітаміну С (1 мг / мл) і доводять об'єм водою до 100 мл).</p> <p>5. До 1 мл розчину вітаміну С (5,0% розчин в Н2О) додають 0,2 мл кислоти азотної розведеної і 0,2 мл розчину срібла нітрату. Утворюється сірий осад металевого срібла.</p> 
<p>ідентифікація</p>	<p>6. Вітамін С з залізом (II) сульфатом в присутності натрію гідрокарбоната образует аскорбинат заліза, пофарбований у фіолетовий колір</p>  <p>7. Вітамін С знебарвлює метиленовийсиній, відновлює [Fe (CN) 6] 3-до [Fe (CN) 6] 4; Fe3 + до Fe2 +, з'єднання Cu2 + до Cu +; MnO-4до Mn2 +; NO-3до NO-2; фосфорно-молибденову кислоту до продуктів синього кольору (реакція використовується при визначенні фосфору в фосfolиписах).</p>
<p>випробування чистоти</p>	<p>Сульфатна зола-не більше 0,1%. Важкі метали-не більше 0,001% (10 ppm). Залізо-не більше 0,002% (20 ppm). Мідь - не більше 0,0005% (5 ppm). Кислота щавлева - не більше 0,2%</p>

<p>кількісне визначення</p>	<p>1. 1. Іодатометрія, пряме титрування. Субстанцію вітаміну С розчиняють в суміші кислоти сірчаної розведеної і воді вільної від оксиду вуглецю і титрують 0,05 М розчином йоду в присутності крохмалю до отримання стійкого синьо-фіолетового забарвлення. 1 мл 0,05 М розчину йоду відповідає 8,81 мг С₆Н₈О₆ (s = 1/2).</p>  <p>2. Метод ВЭЖХ.</p>
<p>кількісне визначення</p>	<p>3. іодометрії, пряме титрування розчином йоду.</p>  <p>4. 4. Алкаліметрія, пряме титрування, індикатор-фенолфталеїн.</p> 

зберігання	У щільно герметизованому неметалічному контейнері, в захищеному від світла місці, при температурі від 15 ° С до 25 ° С.
застосування	Аскорбінова кислота (вітамін С) відіграє важливу роль в регулюванні окислювально-відновних процесів, є потужним антиоксидантом, забезпечує синтез колагену, бере участь в синтезі стероїдних гормонів і катехоламінів, нормалізує проникність капілярів, бере участь в синтезі гемоглобіну, підвищує неспецифічну резистентність, володіє антидотними властивостями, впливає на обмін амінокислот ароматичного ряду, метаболізм тироксину, біосинтез інсуліну. Вітамін С використовується в косметичних препаратах для уповільнення старіння, загоєння і відновлення захисних функцій шкіри, зокрема, відновлення зволоженості і пружності шкіри після впливу сонячних променів. До складу кремів його також вводять для освітлення шкіри і боротьби з пігментними плямами. Вітамін С випускається у вигляді таблеток, капсул, порошків і розчинів для ін'єкцій. Використовується як монопрепарат або в складі полівітамінних препаратів.

Вітамін В3 (пантотенова кислота).

Спосіб отримання - тонкий органічний синтез і мікробіологічний синтез з використанням іммобілізованих клітин бактерій, актиноміцетів (основний метод).

Вітамін РР.

Використовується біотехнологічний метод, метод екстракції з мікроорганізмів, зазвичай з пекарських дріжджів з додаванням попередників. Використовується штам - *Brevibacterium ammoniagenes*.

Аскорбінова кислота.

Тут застосовується в основному хімічний синтез і лише одна стадія здійснюється біотехнологічним способом із застосуванням оцтово-кислих бактерій, які проводять реакцію трансформації d - сорбіта в L-сорбозу. Для отримання сорбози культуру продуцента *Glucobacter oxydans* вирощують в ферментерах періодичної дії з мішалкою, барботером, посиленою аерацією протягом 20-40 годин. Вихід сорбози досягає 98% від початкового сорбіту. Живильне середовище: кукурудзяний дріжджовий екстракт до 20%. Сорбозу виділяють з культуральної рідини. Розвиток мікробіологічного методу отримало розвиток в виробництві 2-кето L - гулонової кислоти - це проміжний продукт синтезу вітаміну С. Продукенти: *Acetobacter*, *Erwinia*, *Glucobacter*. Перспективно створення генно-інженерних штамів продуцентів.

Методична розробка практичного заняття, ОПП «Фармація, промислова фармація», для докторів філософії III освітньо-наукового рівня, фармацевтичний факультет, Дисципліна: «Фармацевтична біотехнологія» стр. 6

Жиророзчинні вітаміни.

Ергостерину (вітамін Д 2)

Ергостерину - це основний компонент стеринів дріжджоподібних грибів роду *Candida*, що використовують вуглеводи. Є кілька варіантів вирощування дріжджів - продуцентів ергостерину.

Продуценти - це дріжджі, цвілі, особливо *Saccharomyces cerevisiae*.

Живильне середовище повинна містити джерела вуглецю, азоту, фосфору. Ферментація йде в аеробних умовах близько 12-20 годин. Для отримання кристалічного вітаміну Д 2, біомасу гідролізують, охолоджують, фільтрують, роблять спиртові екстракти, які обмилують (обробляють лугом), кристалізують, очищають, розчиняючи в ефірі, видаляють ефір, а потім ергостерину опромінюють ультрафіолетовими променями (УФ-опромінення), так як вітамін Д 2 з ергостерину утворюється тільки після ультрафіолетового опромінення (УФ-опромінення).

Джерелом отримання ергостерину може служити і міцелій грибів, який залишається як відхід (побічний продукт) антибиотической промисловості. Мікроорганізми *Cryptococcus curvatus* на середовищах з відходами молочної промисловості і при переробці бавовни синтезують значні кількості ергостерину. Це все відноситься до питання рентабельності і екологічності біотехнологічного виробництва.

β-каротин.

Каротиноїди (політерпени) - це природний пігмент. Загальний шлях біосинтезу з ізопренових одиниць. Джерело - це вищі рослини, водорості, мікроорганізми. Отримання - це тонкий органічний синтез (хімічний спосіб) і біотехнологія (використання міцеліальних грибів) Поживна середу - кукурудзяно-соєве середу. Процес отримання багатостадійний. β-каротин екстрагується соняшниковою олією і використовується у вигляді масляних Якщо використовують хімічний синтез, то більш рентабельно після екстракції його кристалізувати. Вітамін РР - в його виробництві використовується біотехнологічний метод, застосовуючи спосіб екстракції з мікроорганізмів, зазвичай це пекарські дріжджі. Як штаму використовується *Brevibacterium ammoniagenes*.

Убіхінон (коферменти Q) - 2,3 диметокси, 5-метілбензохінон.

Ці сполуки синтезуються в організмі тварин і людини. Участь убихинона в метаболічних процесах проявляє регуляторний ефект, він же бере участь у тканинному диханні, окислювальному фосфолірованія, в перенесенні електронів. Отримання убихинона - це біотехнологія на основі калусних культур рису або пухлинної тканини.

Продуценти - бактерії, дріжджі і дріжджоподібні мікроорганізми. Суха маса грибів роду *Candida* містить суміш убихинона. Це один із прикладів, коли біотехнологія поєднує в єдиному процесі отримання убихинона і ергостерину з

мікробних ліпідів. Застосування убихінон - при ішемічній хворобі серця і при підвищених навантаженнях.

Оцтовокислі бактерії, що використовуються при окисленні сорбіту в сорбозу (при отриманні вітаміну С) містять убихинон-10 з десятьма ізопрена одиницями в бічному ланцюзі, який є коферментом організму людини.

Висновки

1. Застосування генної інженерії при синтезі вітаміну В2 і вітаміну С - відкрило нові можливості селекції високоактивних продуцентів.

2. Впровадження безперервного способу ферментації у виробництві сорбози збільшило швидкості освіти цього цукру майже в два рази.

3. Дробна подача компонентів в живильні середовища забезпечило високий рівень ферментації у виробництві вітаміну В12 і сорбози.

4. Застосування іммобілізованих клітин при отриманні вітамінів В12 і В3 призвело до розробки нових конструкцій біореакторів.

5. Утилізація різних промислових відходів істотно знижує собівартість одержуваної продукції - вітамінів В2, В12 і β - каротину, покращує екологію виробництва. Таким чином, отримання цих важливих біологічно активних речовин (БАР) свідчить про суттєве внесок біотехнології і в цьому секторі фармацевтичної промисловості.

Питання для самоконтролю

- 1.Методи отримання амінокислот
- 2.Механізм регуляції біосинтезу амінокислот.
3. Біосинтез лізину. біосинтез треонина
- 4.Особенности культивування штамів-продуцентів
5. Особливості живильного середовища
6. Умови ферментації амінокислот
- 7.Використання генної інженерії
8. Контроль якості амінокислот

Орієнтовні завдання для опрацювання теоретичного матеріалу

1. Скласти словник основних понять з теми
2. Заповнити орієнтувальну картку для самостійної підготовки студента з використанням літератури з теми:

Основні завдання	Вказівки	Відповіді
1	2	3
Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з	Розкрити питання	Краснопольский Ю.М.Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев –Харьков: НТУ«ХПИ»,Ч.1.2012. – 304с. С. 63

використанням культур рослинних клітин.		
---	--	--

II. Практичні роботи (завдання), які виконуватимуться на занятті

III. Тестові завдання для самоконтролю

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.

IV. Індивідуальні завдання для студентів з теми заняття

Підготувати презентації за темами:

1. Виробництво лізину.
2. Виробництво триптофану в промислових масштабах.
3. Отримання амінокислот хіміко-ферментативним способом.

6. Рекомендована література:

Основна

1. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
2. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.
3. C. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.
4. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
5. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
6. 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.