

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для  
студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 1.**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):**

Объекты биотехнологических производств.

**Тема практического занятия:** «Объекты биотехнологических производств. Классификация и особенности работы с каждой из групп. Культивирование и изучение морфологических характеристик микроорганизмов».

**Цель занятия:** провести изучение макро- и микроморфологических признаков продуцентов при росте на плотных средах и в колбах при глубинном культивировании. Изучить классификацию микроорганизмов.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Понятие о микро- и макроорганизмах.
2. Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических, диагностических препаратов.
3. Классификация биообъектов (микроорганизмы, биообъекты растительного и животного происхождения, клеточные линии).
4. Преимущества использования микроорганизмов в биотехнологических производствах.
5. Особенности работы с каждой из групп биообъектов.
6. Человек как донор.
7. Промышленные биокатализаторы на основе индивидуальных ферментов и мультиферментных комплексов.
8. Понятие биотрансформации.

**Аннотация к занятию:** В биотехнологии используется множество различных биологических систем как для осуществления генетических манипуляций, так и для производства важных в коммерческом отношении продуктов. *Биообъект* — центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, создающий его специфику.

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Наконец, биообъектами могут служить самостоятельные органические молекулы, такие как индивидуальный изолированный фермент.

*Функция биообъекта* — полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом. Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным биокатализатором.

В качестве макромолекул в промышленном производстве используются ферменты всех известных классов, но наиболее часто — гидролазы и трансферазы. Доказано, что использование ферментов в производстве в иммобилизованном виде наиболее рационально, так как в этом случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производственных циклов. В классификации биообъекты рассматривают относительно их принадлежности к микроорганизмам, клеткам растений и животных. В последнее время самостоятельную группу формируют элементы клеток и тканей человека, выступающего в роли донора биологического материала для биотехнологических производств.

Прокариотические и эукариотические микроорганизмы в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение. Они являются продуцентами используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии и т.д. Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых также нашли применение, например, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих. Препараты на основе биомассы отдельных видов микроорганизмов используются в медицине, сельском хозяйстве, аграрной промышленности. Микроорганизмы необходимы также при производстве вакцин. Наконец, микробные клетки методами геной инженерии могут быть превращены в продуценты видоспецифических для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т.д.

Высшие растения являются традиционным и к настоящему времени все еще наиболее обширным источником получения лекарственных средств. При использовании растений в качестве биообъектов основное внимание сосредоточено на вопросах культивирования растительных тканей на искусственных средах и открывающихся при этом новых перспективах.

Традиционным источником клеточных линий являются представители животного мира. Довольно часто в качестве биообъектов выступают клетки и ткани млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, членистоногих, рыб, моллюсков. Разнообразие образуемых ими биологически активных соединений, нашедших применение в медицине, крайне велико и формирует основу лекарственных и диагностических средств.

В последние десятилетия в связи с развитием технологии рекомбинантной ДНК стремительно возрастает важность человека как биообъекта. За счет такого подхода был ликвидирован дефицит сырья для получения видоспецифических белков человека. Методы генетической инженерии представили исследователям исключительно ценную возможность — изменять генетическую программу бактериальных, растительных и животных клеток.

При работе с каждым видом биообъекта учитываются его морфо-функциональные характеристики и составляются рекомендации относительно процесса ферментации. Ценность каждого биообъекта (будь это вирус или молекула, бактериальная, растительная или животная клеточная система либо молекула генетического материала) определяется его неповторимостью в организационно-эволюционном смысле и, как следствие, индивидуальными возможностями синтеза конкретного целевого продукта с требуемыми на сегодняшний день свойствами.

**Оборудование и техническое оснащение:** образцы культурной жидкости, чашки Петри, колбы, стекла предметные, микроскоп, таблицы, отражающие строение прокариот и эукариот.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Мотивируйте многообразие применяемых в биотехнологических процессах биологических систем.
2. Современная классификация биообъектов.
3. Характеристика прокариот и эукариот.
4. Основные свойства *E.coli*, *S.cerevisiae*.
5. Преимущества использования микроорганизмов.
6. Требования к работе с микроорганизмами в качестве объектов биотехнологических производств.
7. Что означают термины «грамтрицательный», «грамположительный», тинкториальные свойства?
8. Особенности культивирования вирусов.
9. Понятие о вирусах. Основные морфо-функциональные характеристики.
10. Определение биокатализатора. Понятие биотрансформации.
11. Объясните понятия первичной клеточной культуры, устойчивой клеточной линии, чистой линии, клона, штамма.

### **Рекомендуемая литература:**

#### **Основная литература**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. -М.: Наука, 1989. - 136 с.
5. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
6. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
7. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)
8. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

#### **Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. - М: Медицина, 11 изд., 1990. - 398 с.
3. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.
4. Саруханов А.В., Быков В.А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. - М.: Колос, 1993. - 384 с.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 2.**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Слагаемые биотехнологического производственного процесса.

**Тема практического занятия:** «Изучение морфологических особенностей микроорганизмов – продуцентов БАВ в различные фазы роста. Выбор оптимальных параметров биосинтеза».

**Цель занятия:** обучить студента оперировать понятиями: культура продуцента, культуральная жидкость, критерии биосинтеза, оптимальный биосинтез. Выработать способность анализировать ферментационные процессы при получении БАВ и обоснованно выбирать оптимальные параметры биосинтеза.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Иерархическая структура биотехнологического производства.
2. Схема последовательно реализуемых стадий превращения исходного сырья в лекарственное средство.
3. Микробиологическая лаборатория. Отделение чистой культуры. Подготовительные операции при использовании в производстве биообъектов микроуровня.
4. Отделение приготовления питательных сред. Комплексные и синтетические питательные среды, их компоненты.
5. Методы стерилизации питательных сред.
6. Стерилизация ферментационного оборудования и компонентов процесса.
7. Критерии подбора ферментеров.
8. Отдел ферментации. Требования к ферментационному процессу в зависимости от физиологического значения целевых продуктов для продуцентов.
9. Методы культивирования.
10. Выделение, концентрирование и очистка биотехнологических продуктов.

**Аннотация к занятию:** Промышленный биотехнологический процесс обычно состоит из трех ключевых этапов. Исходная обработка предполагает подготовку исходного сырья

таким образом, чтобы его можно было использовать как источник питательных веществ для биообъекта. Затем проводят ферментацию и биотрансформацию, обеспечивающие рост организмов-мишеней в биореакторах с последующим образованием нужного метаболита. Третий этап - конечная обработка, которая включает очистку нужного вещества от компонентов культуральной среды или от клеточной биомассы. Большое разнообразие биотехнологических процессов, нашедших промышленное применение, приводит к необходимости их классификации по признаку целевого продукта с учетом наиболее существенных с технологической точки зрения аспектов промышленных биотехнологических процессов. В этом плане наиболее эффективно рассмотреть, какие стадии включает в себя типичный процесс промышленной биотехнологии, каковы общие черты и различия этих стадий в зависимости от конечной цели производства.

Основными стадиями биотехнологического производства можно считать пять операций, которые взаимосвязаны, но различаются по целям и принципам их достижения. Две начальные стадии включают подготовку сырья и биологически действующего начала. В процессах инженерной энзимологии они обычно состоят из приготовления раствора субстрата с заданными свойствами (рН, температура, концентрация и т.д.) и подготовки партии ферментного препарата данного типа, нативного или иммобилизованного. При осуществлении микробиологического синтеза необходимы стадии приготовления питательной среды и поддержания чистой культуры, которая могла бы постоянно или по мере необходимости использоваться в процессе. Классификация питательных сред позволяет соотносить физиологические особенности продуцента с конечным продуктом. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - по существу, ключевая задача любого микробиологического производства, поскольку только высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданной производительностью. В этой связи роль микробиологической службы на современном биотехнологическом производстве трудно переоценить.

В рассматриваемой последовательности третьей оказывается стадия ферментации, т. е. та основная стадия, на которой происходит образование целевого продукта. Метод ферментации определяется возможностями предприятия, конечной целью производства и типом питательного субстрата. Подобно тому, как в химической технологии собственно химическое превращение в реакторе определяет не только результаты производства, но и стратегию осуществления последующих процессов выделения и очистки продуктов, на стадии ферментации идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, а затем, если это необходимо, в целевой метаболит. Особое место в промышленной биотехнологии занимает четвертая стадия общего производственного цикла, на которой из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных водных растворов или суспензий, содержащих, кроме целевого, большое количество веществ, находящихся в смеси часто в довольно больших количествах. Это делает весьма специфичной и сложной задачу разделения и очистки основных, с точки зрения целей производства веществ. Как правило, микробиологический синтез требует на стадии выделения разделять смеси веществ часто очень близкой природы, находящихся в растворе в сравнимых концентрациях, да к тому же еще зачастую весьма лабильных, легко подвергающихся термической деструкции.

Заключительным этапом биотехнологического производства, как и в химической технологии, является приготовление товарных форм продуктов, однако и здесь, несмотря на схожесть задач, имеются существенные особенности. Одна из них — необходимость выпуска препаратов, в частности для медицинских целей, в стерильной форме, что требует специальных решений на стадии расфасовки и укупорки продукта. Общим

свойством подавляющего большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, поскольку сами эти продукты склонны к разложению, например лизису, что приводит к их непригодности для использования.

В связи с этим особое внимание уделяется методам стерилизации питательных сред и всего оборудования, задействованного на каждой из стадий, а также дезинфекции помещений и цехов. В каждом конкретном случае с этой целью производят подбор антимикробных препаратов, методов стерилизации и дезинфекции.

**Оборудование и техническое оснащение:** образцы культурной жидкости, чашки Петри, колбы, стекла предметные, микроскоп, мультимедийная иллюстрация по теме «Типы культивирования».

### ***Вопросы для самоконтроля студентов:***

1. Охарактеризуйте каждый из этапов биотехнологического производства.
2. Определите структуру биотехнологического цеха.
3. Классификация и состав питательных сред.
4. Методы стерилизации питательных сред.
5. Определение процесса ферментации. Глубинное, проточное, твердофазное культивирование. Преимущества и недостатки соответствующих методов.
6. Стерилизация ферментационного оборудования и компонентов процесса.
7. Понятия асептики, антисептики и дезинфекции. Антисептики и дезинфекторы.
8. Антимикробное действие физических и химических факторов.
9. Методы стерилизации, используемая аппаратура.
10. Методы контроля эффективности стерилизации, действия антисептических и дезинфицирующих веществ.
11. Обработка клеточной суспензии по завершении процесса ферментации.
12. Стратегия очистки рекомбинантного белка, секретируемого в культуральную среду.
13. Преимущества и недостатки механического разрушения клеток по сравнению с химическим.
14. Способы сбора клеток по завершении ферментации. Преимущества и недостатки соответствующих методов.
15. Аспекты контроля процесса ферментации и повышения эффективности (концентрации кислорода, температура, рН среды, перемешивание, повышение плотности культуры).

### **Рекомендуемая литература:**

#### **Основная литература**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. -М.: Наука, 1989. - 136 с.
5. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
6. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

#### **Дополнительная литература:**

1. Междисциплинарные исследования в медицине. Сарвилина И.В., Каркищенко В.П., Горшкова Ю.В. – М:Техносфера,2007.-368с.
2. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
3. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. - М: Медицина, 11 изд., 1990. - 398 с.
4. Иммуобилизованные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.-М.:Мир, 1988.
5. Саруханов А.В., Быков В.А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. - М.: Колос, 1993. - 384 с.
6. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 288 с.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 3.**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Методы создания и совершенствования биообъектов.

**Тема практического занятия:** «Препараты на основе биомассы растений, полученные методом *in vitro*».

**Цель занятия:** освоение технологии получения растительного сырья *in vitro* и методы его идентификации.

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Определение и задачи клеточной инженерии.
2. Типы растительных тканей. Способы их выращивания.
3. Особенности строения растительных клеток.
4. Методы культивирования культур растительных клеток.
5. Основные характеристики культур растительных тканей: гормоннезависимость, физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность.
6. Понятие тотипотентности, дедифференцировки и вторичной дифференцировки.
7. Методы выращивания одиночных клеток.
8. Определение соматической гибридизации, гибридов и цибридов.
9. Определение протопластов. Актуальность их использования.

**Аннотация к занятию:** Использование культур клеток и тканей растений помогает спасти от уничтожения ставших уже редкими тысячи дикорастущих растений, которые синтезируют необходимые для жизнедеятельности человека вещества. Рост городов, вырубка лесов, ухудшение экологии, усиленная эксплуатация дикорастущих и плантационных растений — традиционного источника лекарственных средств - приводят к растущему дефициту сырья.

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах помимо решения ряда экономических, экологических и технологических задач позволяет, в частности, преодолеть ряд проблем:

- свести к минимуму влияние климатических, сезонных и географических условий;
- сократить посевные площади в хозяйственном обороте страны;

- получать уже известные, присущие интактному растению, вещества, например никотин, кофеин, хинин, и синтезировать новые биологически активные соединения;
- использовать культуры растительных клеток для биотрансформации конечных продуктов.

Использование новых технологий получения биомассы лекарственных растений (содержащих то или иное активное начало) в виде каллусных и суспензионных культур имеет ряд преимуществ:

- стандартность накапливаемого сырья;
- высокий выход активного начала;
- сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы;
- возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, унгерея и др.;

использование разных технологических режимов; использование методов иммобилизации и биотрансформации для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применительно к растительным клеткам.

Однако растительные клетки и ткани имеют свои особенности, затрудняющие работу с их культурами (по сравнению с клетками микроорганизмов):

- размеры клеток растений (15 — 1 000 мкм) в 50— 100 раз больше, чем клеток бактерий;
- в результате роста клеток растений у них появляется большая вакуоль, при этом все физические и химические константы клеток изменяются;
- суспензионные культуры состоят из клеток-агрегатов разного размера;
- культуры клеток растений имеют целлюлозную стенку, что весьма затрудняет работу биотехнолога с такими культурами.

Промышленный способ выращивания изолированных культур дает возможность за сравнительно короткий срок (30 — 45 сут) получить значительный объем ценного лекарственного сырья, используя каллусные и суспензионные культуры.

Метод получения лекарственных средств на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани, образующейся в местах повреждения органов растения в результате процесса дедифференцировки, и основан на свойстве клеток, называемом тотипотентностью. Затем при добавлении ростовых факторов ауксинов и цитокинов происходит вторичная дифференцировка клеток, направленная на процессы морфогенеза, гистогенеза, органогенеза и соматического эмбриогенеза. Биотехнолог останавливает процесс вторичной дифференцировки на стадии, максимально обеспечивающей выход целевого продукта. Существенную роль в дифференцировке клеток играют как генотип растения продуцента, так и условия культивирования (асептика, физические факторы, состав питательной среды, подбор и соотношение ауксинов и цитокинов, влажность, соответствующий вид биореакторов для глубинного культивирования).

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов — очень перспективное направление. Синтез вторичных метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток в регулируемых условиях, поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают на малых площадях в отличие от больших массивов плантаций с необходимыми растениями. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. Например, выход аймалина и серпентина в культуре клеток *Catharanthus roseus* составляет 1,3 % сухой массы, а в целом растении — 0,26 %. В культуре клеток *Dioscorea deltoidea* диосгенин синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях растений его содержание составляет 20 мг на 1 г сухой массы. Кроме того, в культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для

исходного растения, либо расширяется набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, либо вещества, содержащиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так, в культуре клеток *Paraver bracteatum* содержится сангвирин, характерный для ювенильных растений, и отсутствует тебаин, синтезируемый взрослыми растениями.

**Оборудование и техническое оснащение:** образцы культуры клеток женьшеня, колбы, стекла предметные, микроскоп, сушильный шкаф, мультимедийная иллюстрация по теме «Методы культивирования изолированных клеток».

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Назовите методы селекции, используемые в культуре тканей и клеток растений.
2. Почему явление тотипотентности имеет большое значение при получении БАВ из растительного сырья?
3. Приведите преимущества растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток, перед сырьем из плантационных и дикорастущих растений.
4. Какие методы стерилизации растительных клеток вам известны?
5. Из каких стадий состоит технология получения биомассы?
6. Какие компоненты должна содержать среда культивирования?
7. Приведите основные характеристики растительных клеток.
8. Какие причины ограничивают применение растительных культур в фармацевтической промышленности?
9. Расскажите об основных методах культивирования изолированных клеток и тканей?
10. Почему фитогормоны являются обязательными компонентами питательных сред?
11. Обоснуйте, почему протопласты являются ценным объектом биотехнологических производств.

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. -М.: Наука, 1989. - 136 с.
5. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
6. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

#### **Дополнительная литература:**

1. Междисциплинарные исследования в медицине. Сарвилина И.В., Каркищенко В.П., Горшкова Ю.В. – М:Техносфера,2007.-368с.
2. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
3. Иммуобилизованные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.- М.:Мир, 1988.
4. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.
5. Современная генетика/ Под ред. Ф. Айала, Д. Кайчур. - М.: Мир, 1987.
6. Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии/ Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. - Л.: Наука, 1986. - 256 с.
7. Сазыкин Ю.О. Антибиотики как биохимические реагенты. - М.: ВИНТИ, 1984.-203 с.
8. Саруханов А.В., Быков В.А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. - М.: Колос, 1993. - 384 с.
9. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 288 с.

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 4.**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Методы создания и совершенствования биообъектов.

**Тема практического занятия:** «Аспекты получения видоспецифических белков человека с помощью рекомбинантных штаммов».

**Цель занятия:** ознакомить студентов с некоторыми аспектами деятельности генных инженеров, занятых как в области фундаментальных исследований биотехнологии, так и в производственной практике.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Определение и задачи клеточной инженерии.
2. Типы растительных тканей. Способы их выращивания.
3. Особенности строения растительных клеток.
4. Методы культивирования культур растительных клеток.
5. Основные характеристики культур растительных тканей: гормонезависимость, физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность.
6. Понятие тотипотентности, дедифференцировки и вторичной дифференцировки.
7. Методы выращивания одиночных клеток.
8. Определение соматической гибридизации, гибридов и цибридов.
9. Определение протопластов. Актуальность их использования.

**Аннотация к занятию:** Отличие клеточной инженерии от генной инженерии в том, что в генной инженерии имеют дело с изолированными ДНК, с которыми работают *in vitro*.

Суть технологии: производят соединение фрагментов ДНК *in vitro* (в пробирке) с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку. Чистая генная инженерия – это техника обмена изолированными фрагментами ДНК. Это происходит с помощью ферментов, которые относятся к эндонуклеазам (например, рестриктазы).

Цели генной инженерии: создание новых продуцентов для выработки новых целевых продуктов (новые лекарственные средства, диагностические и профилактические препараты).

Необходимые условия для осуществления генной инженерии:

1. Наличие биообъекта, который способен синтезировать чужеродный белок, воспринимать и передавать генетическую информацию.

2. Организм человека не должен отторгать продукт, синтезированный продуцентом.
3. Клетка должна делиться, необходимо, чтобы гены, продуцирующие целевой продукт у клеток, образующихся после деления, экспрессировались (работали).
4. Необходимо иметь транспортное устройство для внесения ДНК в клетку.

Терапевтические рекомбинантные (rDNA) белки представлены основным продуктом компаний в биотехнологической промышленности в течение последних 20 лет. Клиническая эффективность генно-инженерных цитокинов доказана на основании результатов международных многоцентровых рандомизированных научных исследований. Для некоторых цитокиновых препаратов (преимущественно для интерферонов) имеются международные стандарты назначения и российские методические рекомендации по лечению конкретных инфекционных заболеваний, а также сопутствующих иммунных нарушений.

Постоянно возвращаясь к термину «технология рекомбинантных ДНК», следует помнить, что это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой. Данная технология создала предпосылки для возникновения биотехнологии и явила собой быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов, растений и животных с заранее заданными генетическими характеристиками.

Основные современные иммунобиотехнологические платформы:

1. Улучшенные новые типы интерлейкинов для онкологии.  
Увеличивающиеся инвестирования направлены на понимание роли интерлейкинов в онкологии и при воспалении. В настоящее время исследуется роль IL-12 как потенциального кандидата для лечения рака почки и меланомы. В стадии доклинических испытаний находится рекомбинантный агонист IL-7 и одновременно работают над продвижением интерлейкина-6 в качестве потенциального лекарства от рака.
2. Технология лекарств следующего поколения на основе белков путем слияния гена, который экспрессирует человеческий альбумин с геном, который экспрессирует терапевтический белок. Такая новая противоопухолевая форма интерлейкина-2 способна проявлять удлиненное распределение в тканях и остается в циркуляционном пути дольше, чем рекомбинантный интерлейкин-2, потенциально претендуя на улучшенный клинический эффект и менее частое применение (Albuleukin).
2. Сочетание гликозилирования и ПЕГилирования для улучшения новых колониестимулирующих факторов.
3. Разработка двух новых интраназальных форм интерферона альфа и интерферона бета-1a для лечения гепатита и рассеянного склероза, соответственно. Все больше доказательств, что назальная форма доставки лекарства повышает его эффективность и имеет меньше побочных эффектов, чем инъекционная форма.
4. Система доставки гена интерферона.

Biogen-IDEC разрабатывает генотерапию, основанную на терапевтическом продукте, который доставляет гены бета-интерферона внутрь опухоли, как потенциальный способ лечения определенных типов рака. Ген бета-интерферона запускает механизм действия, который может помочь ингибировать рост клеток опухоли и убить опухолевые клетки.

Методами генетической инженерии получают антибиотики, моноклональные антитела и цитокиновые препараты. Технологии рекомбинантных ДНК широко применяются в сельском хозяйстве и медицине (диагностика, генотерапия и т.д.)

**Оборудование и техническое оснащение:** образцы культуры клеток женьшеня, колбы, стекла предметные, микроскоп, сушильный шкаф, мультимедийная иллюстрация по теме «Методы культивирования изолированных клеток».

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Назовите методы селекции, используемые в культуре тканей и клеток растений.
2. Почему явление тотипотентности имеет большое значение при получении БАВ из растительного сырья?
3. Приведите преимущества растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток, перед сырьем из плантационных и дикорастущих растений.
4. Какие методы стерилизации растительных клеток вам известны?
5. Из каких стадий состоит технология получения биомассы?
6. Какие компоненты должна содержать среда культивирования?
7. Приведите основные характеристики растительных клеток.
8. Какие причины ограничивают применение растительных культур в фармацевтической промышленности?
9. Расскажите об основных методах культивирования изолированных клеток и тканей?
10. Почему фитогормоны являются обязательными компонентами питательных сред?
11. Обоснуйте, почему протопласты являются ценным объектом биотехнологических производств.

### **Рекомендуемая литература:**

#### **Основная литература**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
4. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
5. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)
6. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

#### **Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Иммуобилизованные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.- М.:Мир, 1988.
3. Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии/ Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. - Л.: Наука, 1986. - 256 с.
4. Шилова СВ., Пузакова СМ. и др. Организация производства лекарственных средств с учетом правил ОМР. Химико-фармацевтическое производство, обзорная информация. - М.: ВНИИСЭНТИ, 1990. - 36 с.
5. Саруханов А.В., Быков В.А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. - М.: Колос, 1993. - 384 с.

6. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 288 с.



Кафедра биологии с курсом медицинской генетики

Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.

Занятие 5.

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биоиндустрия ферментов.

**Тема практического занятия:** «Влияние условий иммобилизации на продуктивность микробных клеток».

**Цель занятия:** ознакомить студентов с методами и условиями иммобилизации живых микробных клеток.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Определение иммобилизованных ферментов.
2. Понятие об активации матрицы.
3. Классификация носителей для иммобилизации ферментов и клеток.
4. Химические методы иммобилизации.
5. Физические методы иммобилизации.
6. Основные направления в применении иммобилизованных ферментов, крупномасштабные производства, применяемые для получения диетического, лечебного питания.
7. Строение и применение биосенсоров.
8. Применение иммобилизованных ферментов в медицине

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

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

Преимущества иммобилизации биообъекта:

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

#### 4. устойчивость к внешним воздействиям.

Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют физические методы: ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. К природным материалам относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, ионообменные смолы и так далее; захват фермента в сетку геля или полимера; адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах); микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5-300 микрон). Применяются также химические методы иммобилизации, целью которых является формирование ковалентных связей между молекулой фермента и носителем. Ковалентная сшивка (сшивание) молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента осуществляется после процесса активации матрицы.

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

В последнее время получило достаточно широкое распространение применение иммобилизованных клеток микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов. Преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с иммобилизованными ферментами заключается в том, что при их использовании отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов, которые обходятся производству значительно дороже в осуществлении полного технологического процесса. Кроме того, ферменты в микроорганизме находятся в своем естественном окружении (они термостабильны, работают более длительно, сохраняют свои каталитические свойства достаточно долго, они не уступают иммобилизованным ферментам в свойствах гетерогенных биокатализаторов). Иммобилизация целых клеток микроорганизмов проводится аналогично иммобилизации ферментов, предотвращая их размножение, увеличивая сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с необработанными клетками.

**Оборудование и техническое оснащение:** колбы и стеклянные пипетки объемом до 50 мл, гранулы ПААГ с иммобилизованными клетками, весы аналитические, термостат, спектрофотометр

#### *Вопросы для самоконтроля студентов:*

1. Дайте определение понятия иммобилизации биообъектов.
2. Каким образом биообъект может быть связан с нерастворимым носителем?
3. Какие типы нерастворимых носителей вы знаете?
4. Каковы преимущества метода иммобилизации биообъектов при получении лекарственных веществ?
5. Какими свойствами должен обладать носитель при иммобилизации ферментов?
6. В чем суть метода включения ферментов в липосомы?
7. Какие методы иммобилизации клеток микроорганизмов вы знаете?
8. В каких случаях иммобилизации целых клеток-продуцентов лекарственных веществ нерациональна?

9. Чем обусловлены экономические преимущества биотехнологического производства, основанного на иммобилизованных ферментах, перед традиционным?
10. Каких целей достигают при иммобилизации ферментов в биотехнологическом производстве?
11. Как можно добиться выделения целевого белкового продукта, локализованного внутри иммобилизованной клетки, не нарушая системы?
12. Как можно определить жизнеспособность микроорганизмов при иммобилизации клеток *A. globiformis* в ПААГ?
13. В чем состоит основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией?
14. Какие ограничения иммобилизации индивидуальных ферментов вы знаете?

#### **Рекомендуемая литература:**

##### **Основная литература**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
5. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
6. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)
7. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

##### **Дополнительная литература:**

1. Междисциплинарные исследования в медицине. Сарвилина И.В., Каркищенко В.П., Горшкова Ю.В. – М.:Техносфера,2007.-368с.
2. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
3. Иммобилизованные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.- М.:Мир, 1988.
4. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.
5. Современная генетика/ Под ред. Ф. Айала, Д. Кайчур. - М.: Мир, 1987.
6. Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии/ Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. - Л.: Наука, 1986. - 256 с.
7. Сазыкин Ю.О. Антибиотики как биохимические реагенты. - М.: ВИНТИ, 1984.- 203 с.
8. Шилова СВ., Пузакова СМ. и др. Организация производства лекарственных средств с учетом правил ОМР. Химико-фармацевтическое производство, обзорная информация. - М.: ВНИИСЭНТИ, 1990. - 36 с.
9. Саруханов А.В., Быков В.А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. - М.: Колос, 1993. - 384 с.

10. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 288 с.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для  
студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 6.**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биоиндустрия ферментов.

**Тема практического занятия:** «Иммобилизация клеток *E.coli* – продуцента пенициллинациллазы – и получение 6-АПК путем гидролиза бензилпенициллина иммобилизованными клетками».

**Цель занятия:** ознакомить студентов с методами и условиями иммобилизации клеток *E.coli*.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Преимущества использования иммобилизованных ферментов.
2. Основные направления в применении иммобилизованных ферментов.
3. Восемь крупномасштабных производств с использованием иммобилизованных ферментов.
4. Актуальность и технология производства L-аспарагиназы.
5. Актуальность и технология производства 6-аминопенициллановой кислоты.
6. Актуальность и технология производства безлактозного молока.
7. Актуальность и технология производства глюкозо-фруктозных сиропов.
8. Актуальность и технология производства L-аланина из L-аспарагиновой кислоты.
9. Актуальность и технология производства L-яблочной кислоты из fumarовой кислоты.
10. Актуальность и технология производства сахаров из молочной сыворотки.
11. Актуальность и технология производства оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей.

**Аннотация к занятию:** В биотехнологическом производстве все чаще применяют катализ с использованием иммобилизованных ферментов. Ферментативный катализ имеет большое значение для модификации БАВ с целью получения новых ЛС с улучшенными терапевтическими и фармакологическими свойствами. Применение ферментов в процессах трансформации обусловлено высокой специфичностью их биологического действия, связанной со способностью направленно изменять структуру того или иного соединения.

При иммобилизации ферментов (их фиксации на нерастворимом носителе) повышается стабильность и создается возможность многократного использования ферментов. Использование иммобилизованных ферментов имеет и экологические преимущества, так как целевой продукт выделяется из менее сложной гетерогенной реакционной смеси.

Во многих случаях необязательно иммобилизовать изолированный фермент. Иммобилизации могут подвергаться целые микробные клетки, содержащие нужный фермент. При этом еще более повышается стабильность фермента и улучшаются экономические показатели производства.

В области синтеза антибиотиков широкое применение нашла группа ферментов, катализирующих гидролиз ацильных связей у природных антибиотиков группы пенициллина, пенициллинаминогидролазы или пенициллинацилазы. Главным продуктом такого гидролиза является 6-аминопенициллановая кислота — исходный ключевой продукт для синтеза различных полусинтетических пенициллинов (ампициллина, оксациллина, карбенициллина и др.). Основной путь при получении 6-АПК — процесс гидролиза биосинтетического бензилпенициллина ферментом пенициллинацилазой, образуемой некоторыми штаммами кишечной палочки. Иммобилизация клеток *E. coli* с помощью включения их в ячейки альгинатного геля и применение такой формы биологического катализатора в производстве позволили повысить производительность процесса получения 6-АПК из бензилпенициллина и в конечном счете увеличить выпуск создаваемых на ее основе полусинтетических пенициллинов.

**Оборудование и техническое оснащение:** микропипетка, пробирки стерильные объемом 20 мл, пипетка на 5-10 мл с диаметром выходного отверстия 1,5-2 мм, шприц на 10 мл, раствор альгината натрия в воде (4%), гидроклорид кальция, 3,5% раствор бензилпенициллина в 0,01 М фосфатном буфере с рН=7,8, 5% раствор п-диметиламинобензальдегида в 20% растворе уксусной кислоты в этиловом спирте, 18-20-часовая клеток *E. coli*, из которой готовят суспензию в изотоническом растворе хлорида натрия; термостат, качалка, роторный испаритель, весы аналитические, микроскопы, спектрофотометр.

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Какова роль пенициллинацилазы в процессе получения 6-АПК-ядра молекулы всех пенициллинов?
2. Как можно определить каталитическую активность иммобилизованной пенициллиназы?
3. Каким образом можно контролировать протекание ферментативной реакции?
4. На чем основаны классификации ферментов-ацилаз?
5. Почему при использовании альгината необходимо, чтобы в системе отсутствовали фосфаты и цитраты?
6. Какие существуют преимущества и недостатки у носителей органической природы по сравнению с неорганическими?

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиэкономика, 1991. - 303 с.
4. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.

5. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)
6. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

**Дополнительная литература:**

1. Иммунизированные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.- М.:Мир, 1988.
2. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.
3. Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии/ Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. - Л.: Наука, 1986. - 256 с.
4. Сазыкин Ю.О. Антибиотики как биохимические реагенты. - М.: ВИНТИ, 1984.- 203 с.
5. Саруханов А.В., Быков В.А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. - М.: Колос, 1993. - 384 с.
6. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммунизированные клетки микроорганизмов. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 288 с.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для  
студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 7**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биоиндустрия ферментов.

**Тема практического занятия:** Ферментация треонина. Идентификация и определение содержания аминокислот в культуральной жидкости (на примере треонина).

**Цель занятия:** ознакомить студентов с биотехнологическими методами получения чистых L-аминокислот (метод прямого микробиологического синтеза треонина).

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Классификация метаболитов.
2. Определение сверхсинтеза и биотрансформации.
3. Понятие о незаменимых аминокислотах.
4. Биологические свойства аминокислот.
5. Строение и функции аминокислот
6. Способы получения аминокислот (химический, микробиологический, химико-ферментативный синтез, гидролиз белоксодержащего сырья)
7. Механизмы регуляции первичных метаболитов (индукция, ретро-ингибирование, катаболитная экспрессия)
8. Способы преодоления механизмов регуляции первичных метаболитов.
9. Понятие о ауксотрофных и регуляторных мутантах.

**Аннотация к занятию:** Аминокислоты широко применяют в медицине для лечения послеоперационных больных, при лечении заболеваний ЦНС, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, печени. Также целесообразно по медицинским показаниям добавлять незаменимые аминокислоты в продукты питания.

Природные аминокислоты являются, как правило, оптически активными L-формами, тогда как аминокислоты, получаемые химическим синтезом, это рацемические смеси L- и D-форм, которые трудно разделить. Именно поэтому в настоящее время микробный синтез предпочтителен и экономически более выгоден.

Специфические ферменты, регулирующие биосинтез аминокислот, широко распространены у бактерий, однако детально они изучены лишь у некоторых из них, в частности у *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* и др. У грибов в ответ на аминокислотное лимитирование отмечают некоординированное параллельное возрастание уровня ферментов, катализирующих реакции биосинтеза различных аминокислот. В гиперпродукции отдельных аминокислот модифицированными культурами *E. coli*, *Serratia marcescens* и др. важную роль играют различные уровни механизмов внутриклеточной регуляции метаболизма, такие, как ретроингибирование и



согласованная репрессия (например, при биосинтезе ароматических аминокислот на последних стадиях).

Штаммы-суперпродуценты, используемые в производстве, чаще всего получены с применением методов генетики и селекции. При помощи штаммов-суперпродуцентов из родов *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycrococcus* и др. налажено крупнотоннажное производство не только глутамата, но и треонина, лизина, валина, гистидина и других аминокислот. При суперпродукции уровень экспрессии клонированного гена выражается в синтезе специфического белка в количестве не менее 2% от всех растворимых белков клетки-хозяина. В настоящее время существуют суперпродуценты, у которых количество синтезируемого специфического белка достигает 10-50% (здесь важнейшую роль играют многокопийные плазмиды, несущие встроенные гены). Так, генно-инженерными методами во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) был получен штамм *E. coli*, обладающий сверхпродукцией L-треонина (свыше 100 г/л за 40 ч ферментации). Технология получения аминокислот базируется на принципах ферментации продуцентов и выделения вторичных метаболитов, т.е. в начале маточную культуру размножают на агаризованной среде в пробирках, затем на жидкой среде в колбах, инокуляторах и посевных аппаратах, а после этого в головных (основных) ферментерах. Изолированные чистые кристаллы целевого продукта обычно высушивают под вакуумом и упаковывают. Периодические ферментации используют при получении различных L-аминокислот (глутаминовой, фенилаланина, лизина, триптофана и др.). При этом обычно культивируют специальные мутантные штаммы, метаболизм которых по целевому продукту изучен достаточно полно. Так, например, установлено, что лимитирующим агентом коринебактерий, образующих глутаминовую кислоту, является биотин (витамин В<sub>7</sub>, витамин Н) в дозе 1—5 мкг/л. Биотин индуцирует структурно-функциональные изменения в клеточной мембране, благодаря чему увеличивается ее проницаемость для глутаминовой кислоты, выходящей из клетки в культуральную жидкость. Отдельные штаммы продуцентов способны на мелассных средах накапливать более 50 г/л глутаминовой кислоты. Роль биотина аналогична также в случае получения L-пролина, являющегося производным L-глутаминовой кислоты. Крайне перспективными считают способы получения аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов и клеток. В промышленности давно апробирован и налажен процесс получения L-аспарагиновой кислоты из фумаровой и аммиака в одну стадию с помощью иммобилизованных клеток *E. coli* или *Pseudomonas aeruginosa*, обладающих аспартазной активностью. Аспартаза катализирует реакцию присоединения аммиака к фумаровой кислоте. Фермент в иммобилизованном состоянии сохраняет активность на исходном уровне до 2—2,5 нед и более.

**Оборудование и техническое оснащение:** набор аминокислот, нингидрин, раствор аммиака водный, спирт изопропиловый, кислота ледяная уксусная, микробиологические петли, стерильные пробирки, чашки Петри с питательным агаром, микрошприцы, пластинки «Силуфол», мерные колбы, пробирки с притертыми пробками на 10 мл, лабораторные ферментеры с биопродуцентами.

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Назовите методы получения аминокислот и укажите их специфические особенности и различия.
2. Какие микроорганизмы используют для микробиологического синтеза аминокислот?
3. Перечислите лекарственные препараты, содержащие чистые аминокислоты.
4. На какие уровни регуляции внутриклеточного метаболизма воздействуют при создании штаммов-суперпродуцентов аминокислот?

5. Какие параметры необходимо контролировать в процессе ферментации плазмидного продуцента треонина?
6. Каким образом осуществляется автоматическая поддержание в среде оптимальных концентраций источника углерода и азота в процессе ферментации продуцента треонина?
7. Укажите характер роста биомассы и накопления аминокислоты у штамма кишечной палочки – продуцента треонина.
8. Назовите основные преимущества и недостатки биотехнологических методов получения аминокислот по сравнению с химическими.
9. Почему при культивировании штаммов-продуцентов аминокислот необходимо применение подпиток?
10. Какие режимы ферментации используют при промышленном получении аминокислот?

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)

**Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики  
Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для  
студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 8**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биотехнология метаболитов.

**Тема практического занятия:** Биотехнологическое использование микроорганизмов при получении витамина С.

**Цель занятия:** практически обосновать студентам эффективности использования биотехнологических методов в промышленном производстве витамином и коферментов.

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Биологические свойства витаминов
2. Классификация: жирорастворимые, водорастворимые витамины.
3. Зависимость выработки от стадии роста клеток первичных метаболитов в процессе ферментации биообъекта.
4. Технологические условия синтеза витамина В2. Продуценты.
5. Технологические условия синтеза витамина В12 для медицинских целей.  
Продуценты
6. Технологические условия синтеза витамина В12 в качестве кормовых добавок.  
Продуценты.
7. Технологические условия синтеза витамина D, продуценты.
8. Технологические условия синтеза витамина А. Продуценты.
9. Особенности применения генно-модифицированных микроорганизмов в процессе производства витаминов.
10. Препараты витаминов, показания к применению.

**Аннотация к занятию:** Витамины и коферменты являются профилактическими и лечебными препаратами, обладающими широким спектром фармакотерапевтического действия в различных областях медицинской практики. В последнее время достигнуты большие успехи в их промышленном получении с помощью биотехнологических методов.

Один из классических примеров промышленного использовании микроорганизмов в получении витамина С — превращение D-сорбита в L-сорбозу бактериями *Glucanobacter oxydans*. L-сорбоза является промежуточным продуктом синтеза аскорбиновой кислоты, проводимого обычно по методу Рейхштейна. Процесс получения L-сорбозы биотехнологическим способом основан на способности различных штаммов уксуснокислых бактерий к селективному окислению сорбита. В отличие от химического процесса, где в результате окисления сорбита получается смесь продуктов, окислительная трансформация уксуснокислых бактерий характеризуется необычайно точным воздействием на определенные группы в молекулах этих веществ. Данные бактерии превращают многоатомные спирты в сахара, дигидрируя вторичную спиртовую группу полиола в соответствии с правилом Бертрана-Хадсона: «Из двух вторичных спиртовых

групп, находящихся в цис-положении, дегидрируется та, которая примыкает первичной спиртовой группе.

Наиболее сильной окислительной способностью обладают штаммы (*Gluconobacter oxydans* и *Acetobacter melanogenum*). Для получения сорбозы *G. oxydans* выращивают в питательных средах, содержащих высокие концентрации сорбита и дрожжевой или кукурузный экстракт, которые служат источниками азота, витаминов и других веществ, обеспечивающих рост бактерий. Для роста продуцента и окисления сорбита в сорбозу необходимо постоянное поступление кислорода в культуральную жидкость. При высоких концентрациях сорбита лишь небольшая его часть затрачивается на синтез биомассы бактерий. Основное количество сорбита трансформируется в сорбозу, степень конверсии составляет 96—98%. В ходе процесса происходит снижение pH культуральной жидкости. По окончании трансформации фильтрат концентрируют в вакуум-аппаратах при 60 °С. При охлаждении сорбоза выпадает в осадок в виде кристаллов.

**Оборудование и техническое оснащение:** стерильные пипетки, колбы емкостью 750 мл, моровская пипетка, 24-48 часовая культура штамма *Gluconobacter oxydans*, агаровая среда, 5% раствор едкого натра, 50% раствор азотнокислого свинца, дистиллированная вода, термостат, качалка, поляриметр, микроскоп.

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Перечислите витамины, промышленное производство которых основано на использовании биотехнологических методов.
2. На чем основана классификация витаминов?
3. Почему основную часть витаминов от общего количества, производимых в мире, получают химическими методами?
4. Какое сырье является основным источником получения витаминов?
5. Почему потребность организма человека в водорастворимых витаминах выше, чем в жирорастворимых?
6. В чем заключается отличие получения L-сорбозы биотехнологическим способом от химического процесса?
7. Почему биосинтез гулоновой кислоты (важнейший промежуточный продукт при промышленном получении витамина С) из сорбозы так же можно осуществлять, используя штаммы рода *Gluconobacter*?
8. Какие компоненты и с какой целью добавляют в питательную среду при получении сорбозы?
9. Почему необходим микроскопический контроль культуральной жидкости, содержащей живые клетки уксуснокислых бактерий?
10. Как можно определить, что условия культивирования *G. oxydans* нарушены?
11. Приведите схему синтеза аскорбиновой кислоты по методу Рейхштейна.

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
3. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.

4. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)

**Дополнительная литература:**

1. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для  
студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 9**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биотехнология метаболитов.

**Тема практического занятия:** Биотехнологическое использование микроорганизмов при получении витаминов и коферментов (на примере экстракции убихинона-10).

**Цель занятия:** овладеть способами выделения и количественного определения убихинонов.

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Биологические свойства витаминов
2. Классификация: жирорастворимые, водорастворимые витамины.
3. Зависимость выработки от стадии роста клеток первичных метаболитов в процессе ферментации биообъекта.
4. Технологические условия синтеза витамина В2. Продуценты.
5. Технологические условия синтеза витамина В12 для медицинских целей. Продуценты
6. Технологические условия синтеза витамина В12 в качестве кормовых добавок. Продуценты.
7. Технологические условия синтеза витамина D, продуценты.
8. Технологические условия синтеза витамина А. Продуценты.
9. Особенности применения генно-модифицированных микроорганизмов в процессе производства витаминов.
10. Препараты витаминов, показания к применению.

**Аннотация к занятию:**

В последнее время значительно возрос интерес к убихинонам в связи с большими перспективами их применения в качестве лечебных препаратов. Убихиноны представляют одну из групп природных биохинонов, которые играют существенную роль в таких биологических процессах, как фотосинтез, транспорт электронов, окислительное фосфорилирование. По биологической значимости их обычно приравнивают к соединениям типа АТФ, НАДФ, цитохромов. Известны следующие главные группы терпеноидных биохинонов: токохиноны, пластохиноны (Р<sub>0</sub>), убихиноны (Q), менахиноны (МК, витамины К<sub>2</sub>) и филлохиноны (К, витамин К<sub>1</sub>).

Коферменты-убихиноны обозначают К<sub>0</sub> Q<sub>n</sub>, где n — цифровой индекс, показывающий число пренильных (изопреноидных) звеньев и боковой цепи. Число пренильных звеньев в убихинонах может варьировать от 1 до 13.

Убихиноны широко распространены в природе. Их синтезируют животные, растения и микроорганизмы. Количество убихинонов в определенной мере отражает окислительную активность ткани. У высших растений и животных убихиноны в основном

сосредоточены на внутренней мембране митохондрий и микросомах. Главным убихиноном человека и целого ряда животных является Ко Q<sub>10</sub>.

Как было сказано выше, убихиноны относятся к витаминopodobным соединениям, которые синтезируются в организме человека. Однако в ряде случаев может возникнуть их дефицит, приводящий к развитию различных патологических состояний (например, анемии).

#### **Промышленное получение убихинонов**

При промышленном производстве Ко Q<sub>10</sub> с последующим использованием его в терапевтических целях существует метод его экстракции из тканей животных, однако в силу ограниченной доступности источников выделения и низкого содержания в них кофермента этот способ не является основным. Главным образом промышленное получение высших гомологов убихинонов базируется на биотехнологических методах: микробиологическом синтезе, обеспечивающем трансконфигурацию боковой цепи и экстракцию Ко Q<sub>10</sub> из культур растительных клеток. Многие представители микроорганизмов синтезируют убихиноны, причем тип главного Ко Q<sub>10</sub> у микроорганизма имеет таксономическое значение. Богатым источником убихинонов являются бактерии. В связи с этим перспективное направление получения Ко Q<sub>10</sub> — использование биомасс бактерий, отходов уже действующих производств.

Установлено, что биомасса уксуснокислых бактерий, используемых в промышленности для окисления D-сорбита в L-сорбозу, содержит Ко Q<sub>10</sub> без примеси его гомологов. При этом штамм *G. oxydans* ВНИВИ-6 продуцирует 5,6 мг/л, а штамм ВНИВИ-2 — до 7 мг/л убихинона Q<sub>10</sub>. В настоящее время разработана технология, при которой одновременно осуществляется биосинтез Ко Q<sub>10</sub> и окисление D-сорбита в L-сорбозу, причем при экстракции убихинона Q<sub>10</sub> из отсепарированной биомассы, являющейся отходом производства, выход конечного продукта может достигать 85%. Кроме того, на этом примере можно видеть одну из характерных особенностей биотехнологического получения витаминов и коферментов: возможность создания малоотходных производств — наиболее перспективного направления развития промышленного производства ЛС.

#### **Методы выделения и количественного определения убихинонов.**

В настоящее время для выделения и количественного определения убихинонов предложен целый ряд методов. Их использование обычно определяется характером биообъекта, наличием сопутствующих веществ, однако любой из методов состоит из следующих основных этапов: экстракция, хроматографическое разделение полученного материала и количественное определение убихинонов.

Способы экстракции убихинонов из биообъектов.

Высшие гомологи убихинонов — Ко Q<sub>7-10</sub> — при комнатной температуре являются кристаллическими веществами желтого цвета, низшие — жидкости. Убихиноны легко растворимы в жирах и в большинстве органических растворителей и практически не растворимы в воде. Для их экстракции из биомассы обычно используют различные органические растворители. С целью наиболее полного выделения убихинонов биомассы предварительно дополнительно разрушают, дезинтегрируя с помощью ультразвука, или гидролизуют в щелочной среде. Чаще всего исходный материал предварительно гидролизуют спиртовым раствором щелочи, но иногда применяют и прямую экстракцию из нативных или лиофилизированных тканей. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. При омылении разлагается большинство сопутствующих веществ, поэтому убихиноны в дальнейшем легко выделяются хроматографическими методами, но при этом возможно разрушение связанного убихинона и в случае употребления этанольного раствора щелочи замещение метоксильных групп этоксильными.

Для прямой экстракции обычно используют смеси этанол/эфир (3:1), хлороформ/метанол (3:1), ацетон и т.д. При этом из тканей выделяется большое

количество липидов, которые затрудняют дальнейшую хроматографию и спектрофотометрию.

Для проведения редокс-реакции убихиноны экстрагируют из гомогенатов неполярными углеводородами при низкой температуре в присутствии метанола.

### **Хроматографические методы выделения убихинонов.**

От сопутствующих липидов убихиноны отделяют с помощью препаративной колоночной или ТСХ. Для разделения гомологов используют бумажную или тонкослойную хроматографию с обращенной фазой, а также колонки, заполненные порошком полиамида.

Один из наиболее часто применяемых методов выделения убихинонов — ТСХ. Как известно, в ТСХ адсорбентом служит тонкий равномерный слой (обычно толщиной 0,24 мм) сухого мелкоизмельченного материала, нанесенного на соответствующую подложку (стекло, алюминиевую фольгу, пластмассовую пленку). Подвижная фаза движется по поверхности пластинки под действием капиллярных сил. Хроматографический процесс зависит от используемого адсорбента и систем растворителей. После окончания процесса исследуемое вещество элюируют соответствующим растворителем.

### **Количественные методы определения убихинонов.**

Существует ряд методов количественного определения убихинонов. Для этих целей используют реакции с борогидридами и этилцианацетатом. Реакция с этилцианацетатом является достаточно специфичной, и ее обычно применяют при работе с многокомпонентной смесью. Описаны также газохроматографические и ферментативные методы определения убихинонов. Наиболее распространенный и простой способ количественной оценки убихинонов — спектрофотометрический метод.

Характерный максимум поглощения для убихинонов находится в УФ-области (275 нм). При мягком восстановлении убихинон превращается в убихинол, и максимум поглощения смещается до 290 нм, что дает возможность измерять количество вещества, используя различия спектров окисленной и восстановленной форм.

**Оборудование и техническое оснащение:** колба (500 мл) с притертой пробкой, микропипетка, культура штамма *Glucanobacter oxydans*, ацетон, смесь хлороформ/этанол, система хлороформ/этиловый эфир, пластины «Силуфол», спектрофотометр, качалка, хроматографическая камера.

### ***Вопросы для самоконтроля студентов:***

1. Перечислите жирорастворимые витамины, получаемые биотехнологическим способом.
2. Какие основные терапевтические свойства характерны для жирорастворимых витаминов?
3. Почему промышленное производство убихинонов целесообразнее осуществлять, используя биотехнологические методы?
4. Какие свойства убихинонов легли в основу разработки их терапевтического использования в качестве противораковых препаратов?
5. Укажите методы количественного определения убихинонов и охарактеризуйте их.
6. Почему промышленное получение высших гомологов убихинонов базируется в основном на микробиологическом синтезе?
7. Какие свойства отличают убихиноны от группы витаминов?
8. Почему при промышленном получении  $\text{Co Q}_{10}$  используют биомассу живых клеток именно уксуснокислых бактерий (*G. oxydans*)?

### **Рекомендуемая литература:**



**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. -М.: Наука, 1989. - 136 с.
5. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
6. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.

**Дополнительная литература:**

53. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 10**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биотехнология метаболитов.

**Тема практического занятия:** Использование биотехнологических методов при получении стероидных гормонов.

**Цель занятия:** студенты должны овладеть навыками использования ферментной системы микобактерий для биотрансформации ситостерина в АД; освоить методику количественного определения АД в культуральной жидкости.

**Структура занятия:**

Входной контроль: тестирование – 15 минут

- Устный опрос – 20 минут
- Тема и цель занятия – 10 минут
- Выполнение практической работы – 70 минут
- Исходящий контроль – 20 минут

Общая продолжительность занятия 135 минут.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Стероидные гормоны, важнейшие представители.
2. Вещества, используемые для производства стероидных препаратов.
3. Этапы производства стероидных препаратов из ситостерина.
4. Исходный продукт гидроксирования – вещество S.
5. Способы биотрансформации ситостерина, вещества S и его диацетатов.
6. Охарактеризовать промышленное производство гидрокортизона и преднизолона.

**Аннотация к занятию:** В медицинской практике в качестве противовоспалительных, диуретических, анаболических, контрацептивных, противораковых и других ЛС применяют стероидные гормональные препараты. Наиболее важные из них — кортикостероиды, гестагены, эстрогены и андрогены.

Для синтеза этой группы гормонов используют природные соединения, ядром молекулы которых является специфическая циклическая структура — циклопентанпергидрофенантрен. Проведение различных химических модификаций этой структуры дает возможность получать ценные ЛС.

Производство стероидных препаратов в нашей стране основано на использовании соласодина и ситостерина или же импортного диосгенина. Соласодин выделяют из паслена дольчатого, который выращивают на поливных землях в Казахстане, однако урожайность и процентное содержание соласодина в этом растительном сырье сравнительно низкие. Более экономичный вид сырья — ситостерин, который широко

распространен в природе, содержится во всех растениях и может быть выделен из отходов от переработки древесины и целлюлозно-бумажной промышленности.

На этапах производства стероидных препаратов из ситостерина в начале необходимо получить АД. Это превращение в производственных условиях выполняют микобактерии, и поэтому процесс относят к категории биотрансформационных. Образующийся в результате биотрансформации АД накапливается в культуральной жидкости, из которой его извлекают экстракцией хлористым метиленом. Экстрагированный АД образует кристаллы в гексане. Полученный кристаллический АД далее путем химической модификации превращают в следующие лекарственные препараты: тестостерон и его эфиры, метилтестостерон, оксипрогестерона капроат, спиронолактон и др.

Биотрансформация, основанная на использовании микроорганизмов из родов *Absidia* и *Curvularia*, служит этапом при производстве гидрокортизона.

Ферменты, вырабатываемые микроорганизмами, атакуют  $\beta$ -область и трансформируют вещество в гидрокортизон. Повышение выхода гидрокортизона происходит в результате предпочтительного гидроксирования в 11-р положении за счет «экранирования» (подавления) этого процесса в 11-а положении.

Микробиологическое дегидрирование стероидов также имеет большое практическое значение, поскольку введение  $\lambda^{1,2}$ -двойной связи способствует повышению физиологической активности. Например, преднизолон, являющийся 1, 2-дегидроаналогом гидрокортизона, превосходит последний по своей противовоспалительной и антиаллергической активности и вместе с тем дает меньше побочных эффектов при терапевтическом использовании.

К дегидрированию стероидов в положении 1, 2 способны преимущественно бактерии и актиномицеты. В промышленном производстве гидрокортизона и преднизолона процессы гидроксирования и дегидрирования осуществляют при концентрации стероидного субстрата 1 г/л, при этом значительная часть стероида находится в культуральной жидкости в растворенном состоянии. Именно поэтому для извлечения вышеуказанных препаратов культуральную жидкость экстрагируют несмешивающимися с водой растворителями, например этилацетатом. Затем экстракт упаривают в вакууме, а выделенный стероид очищают кристаллизацией. При экстракции стероида из культуральной жидкости утрачиваются огромные объемы растворителя этилацетата: 2000-3000 л на каждый килограмм полученного продукта. Даже с учетом регенерации расход растворителя остается все же большим — около 300 л. Вот почему весьма перспективным считают использование ультрафильтрации и обратного осмоса для концентрирования культуральной жидкости с целью уменьшения количества растворителя, потребляемого для экстракции. Кроме того, можно вообще не использовать растворитель при достаточно полном выделении стероида в кристаллическом виде в процессе концентрирования культуральной жидкости.

**Оборудование и техническое оснащение:** микропипетка, мерный цилиндр, культура микобактерий штамма Р, жидкая питательная среда, кристаллический ситостерин, смесь хлороформа/этанол, система хлороформ/этиловый эфир, пластины «Силуфор», теормостат, качалка, роторный испаритель, весы аналитические, микроскоп, спектрофотометр.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Назовите виды сырья, используемого для синтеза стероидных гормонов.
2. Почему экстракция и выделение стероидов после биотрансформации представляют собой трудную задачу?
3. Приведите характеристики четырех основных групп стероидных препаратов.
4. Какие принципы использования биотрансформации при получении стероидных гормонов вам известны?

5. Назовите преимущества использования биотрансформации ситостерина в АД?
6. В чем заключается принцип контроля процесса биотрансформации стероидов?
7. Укажите способы выделения АД из культуральной жидкости, в которой происходила биотрансформации ситостерина, и его очистки.
8. Какие существуют возможности усовершенствования процесса извлечения биотрансформированных стероидов из культуральной жидкости?

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. -
2. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
3. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

**Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

Кафедра биологии с курсом медицинской генетики

Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.

Занятие 11

Наименование раздела учебной дисциплины (модуля): Биотехнология метаболитов.

Тема практического занятия: Микробиологическая трансформация стероидных гормонов с помощью иммобилизованных клеток.

Цель занятия: студенты должны овладеть методом биотрансформации гидрокортизона в преднизолон с использованием клеток *A. globiformis*, участвующей в 1,2-дегидрировании.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Характеристика микробиологических трансформаций.
2. Классификация микробиологических трансформаций.
3. Реакция дегидрирования в микробиологических трансформациях.
4. Реакция дегидрирования в промышленном производстве, его характеристика.
5. Условия биотрансформации гидрокортизона в преднизолон в реакторах разного типа.
6. Методика иммобилизации клеток *A. globiformis* в ПААГ.

**Аннотация к занятию:**

*Стероидные гормоны* — БАВ, лекарственные формы которых используют в качестве профилактических и лечебных препаратов. И последнее время диапазон их применения в практической медицине значительно расширился. Стероидные гормоны — это средства экстренной терапии благодаря их противовоспалительному, десенсибилизирующему и противошоковому действию. Кроме того, их применяют в качестве диуретических, анаболических, контрацептивных и противораковых средств. В промышленном производстве стероидных лекарственных препаратов преимущество внедрения биотехнологических методов обусловлено:

- возможностью проведения реакций, практически не осуществимых методами химического анализа;
- превращением субстрата в биологически активное соединение в течение одной стадии процесса (в отличие от многостадийного химического синтеза);
- удобством и экономичностью биотехнологических процессов.

**Микробиологические трансформации.**

Возможность проведения уникальных реакций базируется на использовании микроорганизмов в качестве носителей активных полиферментных систем, способных осуществлять целенаправленные трансформации субстрата. Микробиологические трансформации являются одним из направлений применения биообъектов в многостадийном синтезе лекарственных препаратов. Результат микробиологической трансформации не синтез молекулы *de novo* из компонентов питательной среды, а изменение молекулярной структуры трансформируемого вещества.

Классификацию микробиологических трансформаций осуществляют по типу возникновения или отщепления функциональных групп. К основным видам микробиологических трансформаций относят окисление, восстановление, декарбоксилирование, дезаминирование, гидролиз, метилирование, этерификацию, дегидрирование, ацелирование, амидирование, деметоксилирование, изомеризацию и т.д. Перечисление этих процессов показывает широкий спектр реакций, проводимых с помощью ферментативных систем микроорганизмов. Процесс трансформации стероидных соединений — это аэробный процесс глубокой ферментации. Для его реализации обычно используют типовое оборудование, обеспечивающее интенсивный массообмен.

**Оборудование и техническое оснащение:** колбы объемом 20 мл, пипетки стеклянные, пластину «Силуфол», гранулы ПААГ с иммобилизованными клетками *A. globiformis*, термостат, качалка, газожидкостный анализатор для ВЭЖХ, весы аналитические, спектрофотометр.

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Почему диапазон применения стероидных гормонов в практической медицине в последнее время значительно расширился?
2. На чем базируется возможность проведения уникальных реакций биотрансформации?
3. Приведите классификацию микробиологических трансформаций.
4. Почему среди различных микробиологических трансформаций стероидных соединений особое значение придают реакции дегидрирования?
5. Что является важным фактором сохранения жизнеспособности клеток и продуктивности их ферментной системы?
6. Почему реакция 1,2-дегидрирования является классическим примером микробиологических трансформаций стероидных гормонов?
7. Укажите преимущества использования иммобилизованных клеток в производстве стероидных гормонов.
8. Назовите основные методы контроля процесса биотрансформации гидрокортизона в преднизолон.
9. Что такое «степень биотрансформации гидрокортизона в преднизолон»?
10. Почему для биотрансформации стероидов используют специальные ферментеры?

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. -
2. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
3. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

**Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 12**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биотехнология метаболитов.

**Тема практического занятия:** Микробиологические методы определения антибиотической активности.

**Цель занятия:** освоить принципиальный (методологический) подход к изучению активности антибиотиков на разных этапах их получения и к контролю в соответствии с требованиями ГФ СССР (издание XI, вып. 2 по определению биологической активности антибиотиков).

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Определение и классификация антибиотиков.
2. Инфекции, вызванные природными резистентными возбудителями, а так же возбудителями, с приобретенной резистентностью к большинству применяемых антибиотиков
3. Понятие скрининга БАВ.
- 4, Алгоритм скрининга.
5. Способы оценки эффективности выделенных БАВ.
6. Систематическое положение продуцентов антибиотиков.

**Аннотация к занятию:**

Знание методов выделения БАВ и умение применять их при установлении качества (определение подлинности) и при количественной оценке (количественный анализ) полученного продукта — неотъемлемая часть профессионального образования провизора. Известно, что антибиотики, полученные биотехнологическими методами, составляют значительную часть ЛС на фармацевтическом рынке как в нашей стране, так и за рубежом. Иногда часть такой продукции присутствует в виде различных фальсификаций, которые представляют серьезную опасность для здоровья потребителей. Провизор должен знать особенности биотехнологического производства антибиотиков, а также уметь определять качество и количество целевого продукта, то есть, осуществлять контрольные функции по безопасности и эффективности предлагаемых антибиотиков.

Для определения антибиотикочувствительности и концентрации антибиотиков в растворах, биологических жидкостях и тканях существуют как специальные, так и принципиально схожие методы контроля. Метод диффузии в агар и метод серийных разведений в жидкой питательной среде — наиболее простые и доступные микробиологические методы. При их применении для изучения терапевтического индекса и концентрации (активности) антибиотиков целевые задачи, соответственно, будут различаться.

**Оборудование и техническое оснащение:** стерильные пробирки, чашки Петри, пинцет, пипетки, суспензия тест-микроба, стандарт антибиотика, агаризованная питательная среда, стандарты мутности, стерильный физиологический раствор, термостат, ламинарный шкаф, водяная баня, весы аналитические.

**Вопросы для самоконтроля студентов:**

1. Почему практическое применение генотипических методов для оценки антибиотикочувствительности в настоящее время ограничено?
2. В чем выражается антибактериальная активность?
3. Что является главным показателем антибиотикочувствительности независимо от метода определения?
4. Что можно определять методом диффузии в агар, и какие варианты этого метода существуют?
5. В чем заключается принцип метода серийных разведений?
6. Почему в некоторых случаях содержание антибиотика необходимо контролировать одновременно как стандартными, так и специальными методами?
7. Какие существуют методы микробиологического контроля для определения концентрации антибиотиков?
8. В чем заключается суть метода диффузии в агар?
9. Какой метод определения концентрации антибиотиков считается наиболее точным и в чем заключается его сущность?
10. Что такое «стандарт антибиотика» и для чего его применяют?
11. Что такое «тест-микроорганизмы» («тест-микробы») и какие методы стандартизации при их применении вы знаете?
12. В чем состоят принципиальные различия между определением антибиотикочувствительности и определением содержания антибиотика методом диффузии в агар?
13. На каких этапах получения антибиотиков применяют микробиологические методы определения активности

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

4. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. -
5. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
6. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.

**Дополнительная литература:**

3. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
4. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 13**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биотехнология метаболитов.

**Тема практического занятия:** Выделение антибиотиков из культуральной жидкости, определение подлинности антибиотиков и их количественный анализ.

**Цель занятия:** выработать у студентов умение обоснованно выбирать и практически применять определенный метод анализа антибиотиков.

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Определение и классификация антибиотиков.
2. Инфекции, вызванные природными резистентными возбудителями, а так же возбудителями, с приобретенной резистентностью к большинству применяемых антибиотиков
3. Понятие скрининга БАВ.
4. Алгоритм скрининга.
5. Способы оценки эффективности выделенных БАВ.
6. Систематическое положение продуцентов антибиотиков.

**Аннотация к занятию:** Как правило, процесс биосинтеза состоит из двух основных этапов: ферментации, осуществляемой в биореакторе, и последующего выделения целевого продукта. Применяемый в каждом конкретном случае метод выделения целевого продукта определяется не только тем, где находится продукт (внутри клетки или вне ее), но также молекулярной массой, зарядом, растворимостью, масштабом процесса и стоимостью продукта. Так, в лабораторных условиях для выделения и очистки ценных фармацевтических препаратов с успехом применяют различные хроматографические методы, которые обычно невыгодны в производственных условиях из-за их высокой стоимости и ряда затруднений при масштабировании процесса.

Необходимость применения конкретного метода или операции разделения зависит от начальных свойств культуральной жидкости (вязкости, концентрации продукта, наличия примесей и нежелательных нерастворимых веществ и т.д.), а также от требуемой степени чистоты и конечной формы продукта (кристаллическое вещество, концентрированный раствор, высушенный порошок и т.д.). Неочищенный продукт можно выделить, например, путем простого упаривания культуральной жидкости. Последовательность операций выделения и очистки при получении высокоочищенного целевого продукта выглядит обычно следующим образом:

- Отделение нерастворимых веществ.  
Для этой цели обычно используют такие методы, как фильтрование, центрифугирование и/или отстаивание, седиментацию декантацию.
- Первичное выделение.

Для первичного выделения чаще всего применяют экстракцию растворителями, сорбцию, осаждение и ультрафильтрацию. Последний метод позволяет разделять вещества в соответствии с их молекулярными массами. На стадии первичного выделения значительно возрастает концентрация целевого продукта, причем отделяются в первую очередь вещества, существенно отличающиеся от него по полярности.

- **Очистка.**

В ходе операции очистки обычно происходит отделение примесей, а также дальнейшее концентрирование продукта. Для этой цели используют фракционное осаждение, различные хроматографические методы и адсорбцию.

- **Окончательная очистка продукта.**

После этой процедуры (или нескольких процедур) продукт готов к смешению с другими составными частями композиции или к непосредственной отправке потребителю. На этой стадии применяют центрифугирование с последующим высушиванием кристаллического вещества, сушку распылением или в барабане, сушку лиофилизацией (вымораживанием) или отгонку органического растворителя.

**Оборудование и техническое оснащение:** камеры хроматографические, микропипетки, пинцеты, фен, газовая горелка, УФ-лампа, цилиндры.

***Вопросы для самоконтроля студентов:***

1. Назовите последовательность операций выделения и очистки БАВ.
2. Как можно классифицировать омомицин, галтамицин и фузидовую кислоту?
3. Приведите методы выделения антибиотиков из культуральной жидкости.
4. Какие методы определения подлинности антибиотиков вам известны?
5. Как идентифицируются омомицин, галтамицин, фузидовая кислота в экстрактах культуральной жидкости?
6. Укажите, что может содержать культуральная среда (жидкость) помимо целевого продукта?
7. Укажите, где может происходить локализация целевого продукта при биосинтезе антибиотиков?
8. Какие методы отделения биомассы существуют?
9. От чего зависит выбор метода выделения антибиотика?
10. Какие неспецифические и специфические групповые реагенты можно предложить для идентификации антибиотиков?
11. Как различить омомицин в присутствии галтамицина? Как идентифицируется фузидовая кислота?
12. Какая система растворителей используется в задаче?
13. Какова структура фузидовой кислоты и каковы ее антибиотические свойства?
14. Как можно получить фузидовую кислоту и как определить степень чистоты препарата с количественной оценкой в условия биотехнологического производства.

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. - М.: Изд-во МГУ, 1994.- 512 с.
3. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
4. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)

**Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Сазыкин Ю.О. Антибиотики как биохимические реагенты. - М.: ВИНТИ, 1984.- 203 с.
3. Периодика за 2009-2014 гг.: Изв. хим. общества имени Д.И.Менделеева;
4. Антибиотики и химиотерапия; Биотехнология; Молекулярная биология; Прикладная биохимия и микробиология; Химфармжурнал; Journal of Antibiotics (Japan), Antimicrob. Agents and Chemotherapy (USA).

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 14**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биомедицинские технологии.

**Тема практического занятия:** Классификация вакцин. Технология получения противокоревой вакцины.

**Цель занятия:** ознакомиться с общими принципами технологии получения живых вакцин на примере противокоревой вакцины.

***Учебно-целевые вопросы:***

1. Определение вакцины и вакцинологии.
2. История развития вакцинологии
3. Классификация вакцин по способу производства
4. Определение и характеристики инактивированных вакцин.
5. Определение и характеристики атенуированных вакцин.
6. Определение и характеристики субъединичных вакцин.
7. Определение и характеристики химических вакцин.
8. Определение и характеристики анатоксинов.
9. Классификация вакцин по составу компонентов

**Аннотация к занятию:** Корью болеют только люди, т.е. корь — это антропоноз. Возбудитель кори был открыт еще в 1911 г., однако основные исследования вируса кори были проведены только в 1954 г. Корь — заразное заболевание, передающееся при чихании и кашле. В тяжелых случаях возникают осложнения: воспаление среднего уха, мозга (энцефалит) и легких, которые могут приводить к глухоте, судорогам и гибели больного. Заболевший корью человек служит источником инфекции, начиная с 2—4-го дня до появления сыпи и в последующем в течение острого периода заболевания. Инкубационный период длится в среднем около 2 нед. Во многих странах мира корь занимает ведущее место в общей инфекционной патологии. Ежегодно в мире от всех инфекций умирает 1,6 млн детей, причем корь занимает среди причин смерти первое место: ею заболевают около 45 млн человек, из которых в среднем около 1 млн умирает. Сильнейшая за последние годы вспышка кори была зарегистрирована в Японии, где жертвами этого опасного заболевания стали не только дети, но и взрослые, прежде всего студенты столичных университетов. В связи с крайне быстрым распространением инфекции власти страны даже были вынуждены на некоторое время закрыть эти учебные заведения. В настоящее время в высокоразвитых странах корь не представляет собой масштабной проблемы, поскольку большинство детей проходят вакцинацию в возрасте до 2 лет. Однако в менее развитых странах множество детей умирает от таких осложнений кори, как энцефалит, пневмония и диарея. Эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Всемирного детского фонда (ЮНИСЕФ) разработали

стратегический план по борьбе с корью, благодаря которому в 2005 г. смертность от этой инфекции сократилась вдвое. Тем не менее из-за высокой вирулентности возбудителя заболевания охват вакцинацией должен быть полным практически во всем мире, чего не удастся достичь вследствие трудностей с доставкой вакцины отдельным малодоступным группам детей с высоким риском заражения. По данным ВОЗ, хуже всего ситуация с вакцинацией обстоит в странах Африки. В то же время и в некоторых развитых странах, например, Великобритании, некоторые родители отказываются делать детям прививки против кори, свинки и краснухи, мотивируя это сведениями о связи вакцинации с развитием аутизма.

Наибольшее распространение получили живые вакцины, которые разрабатывают против возбудителей, имеющих устойчивую антигенную структуру. Основой вакцины является получение вакцинного штамма. Вакцинный штамм — это аттенуированный, т.е. ослабленный, дикий (эпидемиологический) вирус. Живые вакцины из аттенуированных микроорганизмов представляют собой культуры наследственно измененных форм патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов), утративших свою патогенность, но сохранивших иммуногенную активность.

Инактивированными их называют потому, что возбудители подвергаются такой обработке, которая приводит к необратимой утрате способности к воспроизведению (репродукции, размножению), но при этом сохраняются антигенные и иммуногенные свойства.

**Оборудование и техническое оснащение:** планшеты пластиковые, 96-луночные, с культурой клеток Vero, инфицированной цитопатогенным вирусом кори, микроскоп инвертированный.

***Вопросы для самоконтроля студентов:***

1. Приведите классификацию и области применения вакцин.
2. В чем заключается отличие вирусов от бактерий?
3. Для чего в процессе получения вакцины необходимо определять титры вируса?
4. Назовите характерные признаки цитопатического действия вируса.
5. Для чего в готовый продукт добавляют стабилизаторы?
6. Какие ограничения применения противовирусных вакцин вы знаете?
7. В чем заключается отличие живых вакцин от инактивированных? Какие из них наиболее широко применяют в настоящее время и почему?
8. Почему при получении противокоревой вакцины в РФ используют вакцинный штамм на основе культуры клеток эмбрионов японских перепелов?
9. Какие отличительные особенности хранения вакцин вы знаете?
10. Почему ликвидация кори является актуальной задачей во всех странах мира?
11. Разработка и создание каких типов вакцин наиболее перспективна, почему?

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. -М.: Наука, 1989. - 136 с.

5. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
6. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
7. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)
8. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.
9. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов : (справочник) Абакумова Т.И. и др. Под ред. М.П.Костинова и Н.А.Озерцовского. Абакумова Т.И. – М.: Миклош, 2005. – 256 с.

**Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Имобилизованные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.- М.:Мир, 1988.
3. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.
4. Периодика за 2009-2014 гг.: Изв. хим. общества имени Д.И.Менделеева; Антибиотики и химиотерапия; Биотехнология; Молекулярная биология; Прикладная биохимия и микробиология; Химфармжурнал; Journal of Antibiotics (Japan), Antimicrob. Agents and Chemotherapy

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)**

**Кафедра биологии с курсом медицинской генетики**

**Методические указания по проведению практических занятий по биотехнологии для  
студентов фармацевтического факультета.**

**Занятие 15**

**Наименование раздела учебной дисциплины (модуля):** Биомедицинские технологии.

**Тема практического занятия:** Препараты на основе живых культур молочнокислых бактерий.

**Цель занятия:** ознакомить студентов с методами микробиологического и биохимического контроля процесса культивирования молочнокислых бактерий, используемых для получения пробиотиков.

**Учебно-целевые вопросы:**

1. Понятие нормофлоры.
2. Микробиологический состав нормальной флоры кишечника.
3. Характеристика лактобактерий, бифидумбактерий, *Sacchara myces*.
4. Этапы выращивания биомассы лактобактерий.
5. Способы очистки биомасс.
6. Классификация препаратов нормофлор.
7. Определение пробиотиков, пребиотиков, симбиотиков. Примеры.
8. Пребиотики.
9. Пробиотики.
10. Симбиотики.

**Аннотация к занятию:** Микрофлора человека составляет основу его микроэкологии. Организм человека населяют примерно 500 видов бактерий, не считая вирусов, простейших и грибов. Нормальную флору принято рассматривать как совокупность микробиоценозов различных частей тела, контактирующих с внешней средой. Совокупность микробиоценозов обозначается как «нормобиоценоз» или «эубиоз». Для здорового человека характерно состояние равновесия микроэкологии организма. Нормальная микрофлора кишечника в процессе эволюции приобрела исключительно важную роль в формировании колонизационной резистентности организма. Защитную роль микрофлоры в обеспечении здоровья трудно переоценить. Изменение равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания в результате более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера.

Факторы, ведущие к нарушениям в состоянии микрофлоры, весьма многочисленны. Возможно, в связи с этим почти 90% населения нашей страны в той или иной мере страдают дисбактериозами, т.е. микроэкологическими нарушениями. Наиболее распространен дисбактериоз кишечника, причинами которого могут быть тяжелые болезни, интоксикации, нерациональное питание, нарушения иммунной системы.

В свою очередь дисбактериоз может служить причиной колитов, холециститов, диатеза, нейродермита, анемии, псориаза, грибковых поражений слизистых оболочек, аллергии.

Широкое применение природных и полусинтетических антибиотиков, ядохимикатов и других продуктов химического синтеза способствует распространению дисбактериозов. Это связано с тем, что указанные соединения подавляют молочнокислые бактерии, обитающие в желудочно-кишечном тракте, и тем самым создают условия для усиленного размножения в нем условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов. Кроме того, дисбактериозы могут возникать при изменении характера питания и под влиянием различных факторов внешней среды, ведущих к стрессам.

Таким образом, поддержание нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и борьба с дисбактериозами — актуальная задача современной медицины и ветеринарии. Она решается путем создания и применения препаратов на основе живых культур микроорганизмов-симбионтов — нормофлоров и пробиотиков (или микробиотиков). Важнейшими компонентами этих препаратов являются молочнокислые бактерии: лактобациллы, бифидобактерии и энтерококки.

**Оборудование и техническое оснащение:** колбы, бюретки, пипетки, бутылки стеклянные, пробирки, чашки Петри, воронки, стекла предметные, петли микробиологические, вода дистиллированная, глюкоза кристаллическая, молоко коровье обезжиренное, томатный сок, пептон, цистеин солянокислый, автолизат дрожжей, агар-агар, термостат, весы лабораторные, рН-метр, спиртовки, водяная баня, микроскоп.

***Вопросы для самоконтроля студентов:***

1. Охарактеризуйте симбиоз человека с микроорганизмами.
2. Каково значение микрофлоры желудочно-кишечного тракта для нормальной жизнедеятельности организма человека?
3. Перечислите механизмы антагонистического действия молочнокислых бактерий на патогенную и гнилостную микрофлору.
4. Почему борьба с дисбактериозами представляет собой актуальную задачу?
5. Назовите штаммы бактерий, используемые для получения препаратов пробиотиков.
6. Перечислите параметры, контролируемые в процессе культивирования молочнокислых бактерий.
7. Расскажите об условиях хранения препаратов на основе живых молочнокислых бактерий.
8. Приведите различия между отдельными видами молочнокислых бактерий, наблюдаемыми под микроскопом.
9. Какие типы симбиоза вы знаете?
10. Каковы причины дисбактериоза?

**Рекомендуемая литература:**

**Основная литература:**

1. Учебно-методические разработки для практических занятий по биотехнологии лекарственных средств./ Под ред. В.А. Быкова. - М.: ММА им. И.М.Сеченова, 1993. - 176 с.
2. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. - М.: Высшая школа, 1987.
3. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. Издательская фирма "Наука", СПб, 1995.-600 с.
4. Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. -М.: Наука, 1989. - 136 с.



5. Биотехнология лекарственных средств. Учебное пособие./Под ред. В.А. Быкова и М.В. Далина. — М.: Медбиоэкономика, 1991. - 303 с.
6. Основы биотехнологии: Учебное пособие для высших пед.учеб.заведений /Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 208 с.
7. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова. – Ростов н/Д.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006. – 256 с. – (Высшее образование)
8. Биотехнология: учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений. / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева ; под. Ред. А.В.Катлинского. – 3-е издание., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.
9. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов : (справочник) Абакумова Т.И. и др. Под ред. М.П.Костинова и Н.А.Озерецковского. Абакумова Т.И. – М.: Миклош, 2005. – 256 с.

**Дополнительная литература:**

1. Биотехнология. Принципы и применение. - Пер. с англ./ Под ред. И. Хиггинса, Д.Беста, Дж.Джойса. - М.: Мир, 1988.
2. Имобилизованные клетки и ферменты. - Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта.- М.:Мир, 1988.
3. Промышленная микробиология/ Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989. - 687 с.
4. Периодика за 2009-2014 гг.: Изв. хим. общества имени Д.И.Менделеева; Антибиотики и химиотерапия; Биотехнология; Молекулярная биология; Прикладная биохимия и микробиология; Химфармжурнал; Journal of Antibiotics (Japan), Antimicrob. Agents and Chemotherapy (USA).