



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**  
до виконання лабораторних робіт  
з курсу  
**«Фармацевтична біотехнологія»**

для студентів спеціальності  
162 «Біотехнології та біоінженерія»

Затверджено  
редакційно-видавничою  
радою університету,  
протокол № 3 від 06.10.2021 р.

Харків  
НТУ «ХПІ»  
2021

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Фармацевтична біотехнологія» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : НТУ «ХПІ». – 46 с.

Укладачі Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

Рецензент Л. В. Кричковська

Кафедра біотехнології, біофізики та аналітичної хімії

## ВСТУП

Фармацевтична біотехнологія є пріоритетним напрямком розвитку сучасної фармації. Сьогодні у арсеналі фахівця-біотехнолога знаходиться великий набір технологічних, фізико-хімічних, мікробіологічних, імунологічних, фармакологічних методів.

Метою даного видання є поглиблення теоретичних знань та формування практичних навичок біотехнологічного одержання препаратів різних фармацевтичних груп та їх контролю. В методичних вказівках наведено накопичений досвід розробки і впровадження біотехнологічних препаратів, одержаний на кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії протягом багатьох років.

Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, здобувач має можливість ознайомитися з теоретичними питаннями та основними новими термінами, а також поглибити свої знання, скориставшись рекомендованою літературою.

У цих методичних вказівках запропоновані три лабораторні роботи: «Дослідження продуктів метаболізму у культуральній рідині “чайного гриба”»; «Одержання, виділення та контроль ферментативної активності бактеріальної амілази»; «Одержання та контроль фосфоліпідного комплексу, збагаченого фосфатидилхоліном (лецитином), для застосування у складі фармацевтичних препаратів». Запропоновані лабораторні роботи передбачають опанування здобувачами широкого спектру технологічних та аналітичних методик: культивування, екстракція, осадження, центрифугування, титриметричний та колориметричний аналіз, хроматографія у тонкому шарі та ін.

Кожна лабораторна робота містить контрольні запитання, що дозволяє систематизувати набуті знання та навички.

## Лабораторна робота 1. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ РІДИНІ «ЧАЙНОГО ГРИБА»

**Мета роботи** – ознайомитися із принципом методів визначення рН, амінного азоту, вітаміну С, загального білка і кислотного числа у культуральній рідині.

### **Основні завдання:**

1. Приготування поживного середовища і посів культури «чайного гриба».
2. Оволодіти методом визначення концентрації водневих іонів (рН) у культуральній рідині.
3. Оволодіти методикою визначення амінного азоту у культуральній рідині.
4. Оволодіти методикою визначення вітаміну С (аскорбінової кислоти) у культуральній рідині.
5. Оволодіти методикою визначення загального білка у культуральній рідині за допомогою біуретової реакції.
6. Оволодіти методикою визначення кислотного числа у культуральній рідині.

Таблиця 1.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4	5	6
<b>Обладнання та матеріали</b>	1. Термостат із температурою 25–30 °С	+					
	2. Ваги аналітичні	+		+		+	+
	3. рН-метр		+	+			
	4. Склянки скляні, 50 мл		+	+		+	+
	5. Папір фільтрувальний		+	+		+	+
	6. Піпетки 5 мл, 10 мл			+	+	+	+
	7. Циліндри мірні			+			
	8. Колби об'ємом 50 мл, 100 мл			+	+		
	9. Бюретка				+		
	10. Фотоелектроколориметр					+	
<b>Сировина</b>	1. Культура чайного гриба	+					

Закінчення таблиці 1.1

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4	5	6
<b>Реактиви</b>	1. Цукор пісок	+					
	2. Вода кип'ячена	+					
	3. Чай листовий	+					
	4. Розчин натрію гідроксиду 0,1 моль/л, Р			+		+	
	5. Розчин хлоридної кислоти 0,1 моль/л, Р			+			
	6. Формалін нейтральний, Р			+			
	7. Розчин натрію гідроксиду 10 %, Р			+			
	8. Розчин натрію тіосульфату, Р				+		
	9. Розчин йоду, Р				+		
	10. Розчин крохмалю, Р				+		
	11. Розчин натрію хлориду 0,9 %					+	
	12. Стандартний зразок білка – альбумін					+	
	13. Калій-натрій тартрат, Р					+	
	14. Мідь сірчанокисла, Р					+	
	15. Калію йодид, Р					+	
	16. Фенолфталеїну розчин, Р						+
	17. Розчин калію гідроксиду 0,1 М, Р						+



## ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

«Чайний гриб» власне грибом не є. У природі широко поширений симбіоз мікроорганізмів. Як об'єкт симбіотичного дослідження нами буде використаний «чайний гриб», що представляє собою культуру дріжджових грибків і оцтовокислих бактерій серед яких головними є два види: дріжджоподібні гриби *Schizosaccharomyces ludwigii* і бактерія *Acetobacter xylinum*. Ці мікроорганізми утворюють на поверхні солодкого чайного розчину товсту слизову плівку. У результаті життєдіяльності мікроорганізму утворюється розчин, що нагадує квас із в міру газованим кислуватим-солодким смаком. На поверхні рідини плаває «товстий диск» – зверху білий щільний і блискучий, а знизу – сіруватий і пухкий шар. Чайний гриб також називають «медузоміцет» через його схожість із медузою.



Рисунок 1.1 – Культура «чайного гриба»



Рисунок 1.2 – Мікрофотографія *Saccharomyces ludwigii*

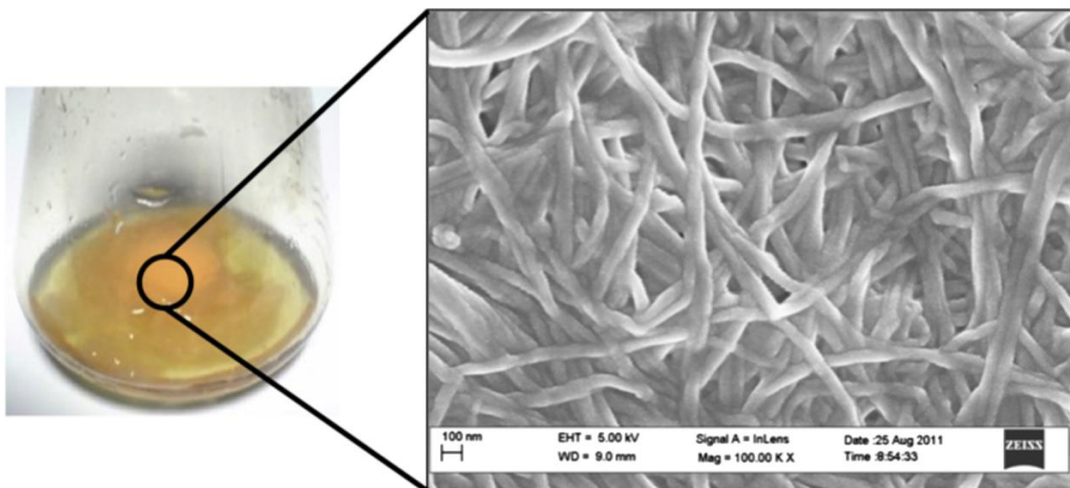


Рисунок 1.3 – Триденна культура *Acetobacter xylinum*

Існує припущення, що колонії дріжджових грибків і оцтовокислих бактерій походять від мікроорганізмів, що населяють ґрунти Приморського краю, які

потрапляли в настій разом із найдрібнішими частинками землі, які прилипли до коріння женьшеню або копитняку. Опинившись у сприятливих умовах ці мікроорганізми активно розмножувалися, утворюючи колонію у вигляді плівки на поверхні рідини. Дослідники припускають, що таким чином виникла культура «чайного гриба», яка потім була поширена по всьому світу.

У ряді аптек Європи настій «чайного гриба» продається і користується великою популярністю. Концентрований «чайний гриб», запатентований в Німеччині під назвою «Комбука», зберігає всі необхідні активні речовини, за винятком оцтової кислоти і спирту. Встановлено, що до складу напою «чайного гриба» входять речовини, життєво необхідні для організму людини: вітаміни групи С, В і РР; органічні кислоти (оцтова, глюкуронова, щавлева, молочна, лимонна); ферменти (каталаза, амілаза, протеаза, ліпаза). У складі культуральної рідини виявлено невелику кількість антибіотиків, що пригнічують розвиток стафілококів, стрептококів та інших бактерій. Найбільш сприятливий вплив на організм людини надає глюкуронова кислота, що проявляє дезінтоксикаційну дію. Молочна кислота пригнічує патогенну мікрофлору кишечника і нормалізує його діяльність. «Чайний гриб» ефективний при атеросклерозі, нормалізує тиск при гіпертонії, сприяє зменшенню головного болю і нормалізує сон.



### **Завдання 1.**

### ***ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА І ПОСІВ КУЛЬТУРИ «ЧАЙНОГО ГРИБА»***

**Увага!** При отриманні культури «чайного гриба» необхідно проводити роботу в асептичних умовах. Роботу проводять в лабораторії фармацевтичної біотехнології кафедри біотехнології, біофізики і аналітичної хімії НТУ «ХП».

Рекомендована концентрація цукру для вирощування «чайного гриба» становить близько 10 %, температура вирощування – 25–30 °С. Тривалість культивування – 14 днів. Вирощування проходить на середовищі, що містить екстракт чаю і цукор. Екстракт чаю служить джерелом азотистих речовин для дріжджів і оцтовокислих бактерій, а цукор – джерело вуглецю.

### **Хід роботи**

1. Закип'ятити 1 л водопровідної води, додати одну чайну ложку чаю. Для отримання ефективного напою необхідно використовувати воду з невеликим вмістом кальцію, наприклад, кип'ячену. Якщо кальцій у надлишку, то при вза-

ємодії з глюкуроновою кислотою він утворює на дні посудини осад глюконату кальцію.

2. Через 25–30 хвилин додати до розчину 100 г цукру піску, ретельно перемішати до повного розчинення, охолодити до температури 25–30 °С.

3. Підготовлений розчин відфільтрувати через металеву сітку в стерильну ємність місткістю 2 л.

4. У фільтроване поживне середовище помістити шар «чайного гриба», отриманого шляхом відділення від зростаючого гриба (маточна культура). «Чайний гриб» розрізають на невеликі шматочки, як по горизонталі, так і по вертикалі.

5. Культивування проводити при температурі 25–30 °С, накривши ємність стерильною тканинною серветкою. Рідина набуває приємний кисло-солодкий смак і перетворюється на в міру газований напій – «чайний квас».

6. При необхідності в ємність можна доливати чайний екстракт, що містить 10 % цукру для отримання нової порції «чайного гриба».

Отриману при вирощуванні гриба культуральну рідину можна використовувати для визначення в ній продуктів метаболізму: білка, вітамінів, амінного азоту та ін.



## **Завдання 2.**

### ***ОВОЛОДИТИ МЕТОДОМ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВОДНЕВИХ ІОНІВ (РН) У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ РІДИНІ***

У біологічних системах постійна величина рН підтримується за допомогою ефективних буферних систем, які завдяки своїй хімічній природі перешкоджають змінам рН, що виникають під час метаболізму кислот (наприклад, молочної або оцтової кислоти) і основ (наприклад, аміаку). Більшість буферних систем, що містяться у клітинних рідинах, включають фосфати, бікарбонат, ацетати, лимонну і барбітурову кислоти та їхні солі. При проведенні біотехнологічних процесів буферні суміші додають безпосередньо до поживного середовища. Так, наприклад, при вирощуванні *Cl. tetani* для отримання правцевого токсину або при вирощуванні культури гриба *Blakeslea trispora* для виробництва β-каротину використовують фосфатні солі калію та натрію.

Чутливість біологічних процесів до рН обумовлена цілим рядом причин. Іони водню можуть виступати як каталізатор ряду процесів, бути реагентом або продуктом реакції. Крім того, при зміні рН може змінитися проникність клі-



тинної мембрани, а, отже, і розподіл речовин або іонів по обидві сторони мембрани. Подібно до інших біологічних структур мембрани містять групи, здатні до іонізації, і залежно від ступеня їх іонізації змінюється конформація, а, отже, і біологічна активність молекул, до яких ці групи входять. Це, передусім, стосується білків та ферментів.

### Хід роботи

1. Перед початком вимірювання рН культуральної рідини необхідно провести контроль приладу за двома буферним розчинам та встановити температуру розчину.

2. Визначення рН проводять потенціометрично із застосуванням скляного електрода. Отримані дані фіксують у лабораторному журналі.



### Завдання 3.

### ***ОВОЛОДИТИ МЕТОДИКОЮ ВИЗНАЧЕННЯ АМІННОГО АЗОТУ У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ РІДИНІ***

Принцип методу заснований на блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично.

### Хід роботи

У склянку об'ємом 50 мл наливають 10 мл аналізованого розчину культуральної рідини і доводять об'єм водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють у досліджуваний розчин, рН якого доводять до 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1 моль/л або HCl 0,1 моль/л. Під час визначення електроди повинні весь час залишатися зануреними в розчин. До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну (рН якого доводять до 7,0 за допомогою 10 % розчину NaOH), перемішують і, не виймаючи електродів, титрують вміст розчином NaOH 0,01 моль/л до рН 9,1. При титруванні використовують бюретки. Проводять три паралельних вимірювання.

Зміст амінного азоту в зразку ( $X$ ) в мг % визначають за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1,4 \cdot \frac{100}{\tilde{N}},$$

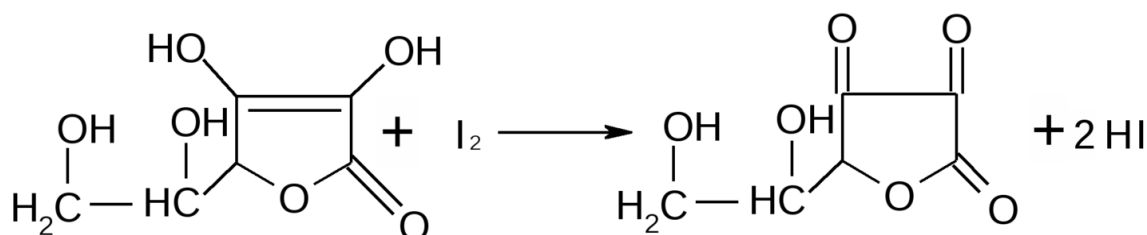
- де  $V$  – об'єм розчину NaOH 0,01 моль/л в мл, що було використано на титрування досліджуваної проби від рН 7,0 до 9,1;  
 $K$  – поправка до титру розчину NaOH 0,01 моль/л;  
 0,14 – кількість амінного азоту в міліграмах, еквівалентну 1 мл розчину NaOH 0,01 моль/л;  
 100 – коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки;  
 $N$  – об'єм культуральної рідини, взятої для аналізу.



#### Завдання 4.

### **ОВОЛОДИТИ МЕТОДИКОЮ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С (АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ) У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ РІДИНІ**

Йодометричне визначення аскорбінової кислоти базується на реакції окислення її до дегідроаскорбінової кислоти:



Кількісно аскорбінова кислота окислюється при надлишку  $\text{I}_2$ , тому у цьому разі використовують метод зворотного титрування: спочатку дають розчин  $\text{I}_2$  з надлишком, а потім той  $\text{I}_2$ , що не прореагував, відтитрують розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

#### **Приготування розчинів:**

1. 0,5 % розчин крохмалю. 0,5 г крохмалю розчинного розтирають у порошок з 5 мл води. Суміш повільно при постійному помішуванні вливають в 100 мл окропу.

2. Робочий розчин йоду 0,001 Н. 0,1 Н розчин  $\text{I}_2$  готують із фіксаналу. У мірну колбу об'ємом 200 мл додають 2 мл 0,1 Н розчину  $\text{I}_2$  та доводять до мітки водою, перемішують.

3. 0,001 Н розчин натрію тіосульфату. 0,1 Н розчин  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  готують із фіксаналу. У мірну колбу об'ємом 200 мл додають 2 мл 0,1 Н розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  та доводять до мітки водою, перемішують.

### Хід роботи

20 мл культуральної рідини додають у колбу. Туди ж відміряють бюреткою 10 мл робочого розчину  $I_2$ , 2–3 хв. добре перемішують. Вміст колби має мати колір йоду (якщо розчин знебарвлюється, додавати ще по 10 мл робочого розчину  $I_2$  до тих пір, поки розчин не перестане знебарвлюватися). Додають 2–3 мл розчину крохмалю і титрують залишок  $I_2$  робочим розчином  $Na_2S_2O_3$ , поки не зникне синій колір від однієї краплини титранта. Визначення повторюють 3–4 рази. Результати титрування записують у таблицю.

Обчислення вмісту аскорбінової кислоти у культуральній рідині (мг/мл) проводять за формулою:

$$W(\text{аск.к-ти}) = \frac{M(1/2\text{аск.к-ти}) \cdot [C(1/2 I_2) \cdot V(I_2) - C(Na_2S_2O_3) \cdot V(Na_2S_2O_3)]}{V(\text{культ.рідини})},$$

де  $C(1/2 I_2)$  і  $V(I_2)$  – концентрація та об'єм (мл) робочого розчину йоду, який до аліквоти культуральної рідини;

$C(Na_2S_2O_3)$  і  $V(Na_2S_2O_3)$  – концентрація та об'єм (мл) робочого розчину натрію тіосульфату, який пішов на титрування надлишку йоду;

$M(1/2\text{аск.к-ти}) = 86,06$  г/моль,  $f_{\text{екв.}(аск.к-ти)} = 1/2$ ;

$V(\text{культ.рідини})$  – об'єм культуральної рідини, взятої на аналіз (аліквота).

#### Завдання 5.



### **ОВОЛОДИТИ МЕТОДИКОЮ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ РІДИНІ ЗА ДОПОМОГОЮ БІУРЕТОВОЇ РЕАКЦІЇ**

Основне застосування спектрофотометрів і фотоколориметрів в лабораторії – це точна колориметрія, тобто вимір кількості хромофора, що утворюється в ході реакції.

Біуретова реакція – кольорова реакція, яку дають з солями міді в лужному середовищі біурет: аміди та іміди кислот, білки, поліпептиди і деякі інші сполуки. Біуретова реакція обумовлена наявністю в молекулах перерахованих сполук групи  $-CO-NH$ . Утворені в результаті біуретової реакції забарвлені сполуки є комплексами. Для мідних біуретових комплексів кожної сполуки характерне

забарвлення (червоне, фіолетове, сине (тільки для білків)) з максимумом поглинання в інтервалі 440–640 нм.

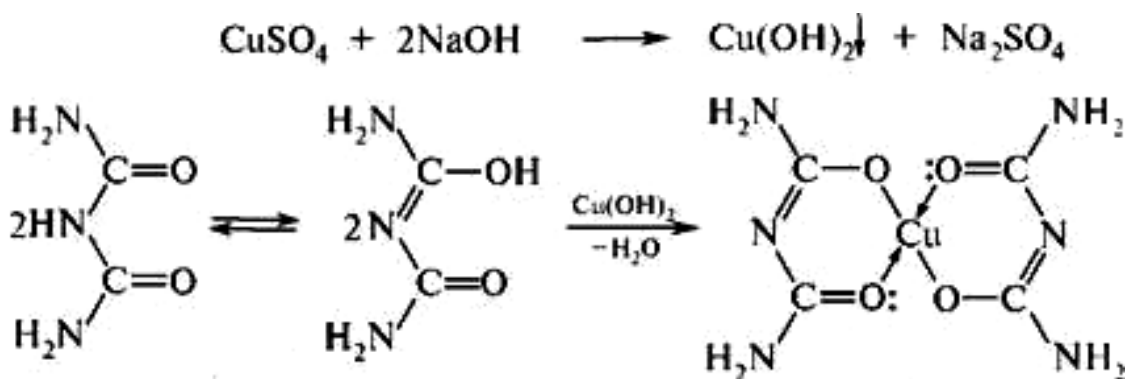


Рисунок 1.4 – Схема біуретової реакції

Біуретова реакція використовується як кольорова реакція на білки (при 540 нм) і лежить в основі кількісних колориметричних визначень. Метод ґрунтується на здатності пептидного зв'язку молекули білка утворювати кольорове комплексна сполука міді в лужному середовищі. Чутливість реакції обмежена.

### Хід роботи

1. Приготування біуретового реактиву: 9 г калію-натрію виннокислого розчиняють у 40 мл розчину натрію гідроксиду (0,2 моль/л), додають 1 г міді сірчаної кислоти. Після розчинення солі додають 1 г калію йодиду і доводять об'єм тим же розчином натрію гідроксиду до 200 мл.

2. Стандартний розчин: стандартний розчин готують зі стандартного зразка білка шляхом розведення 1 мл зразка білка за допомогою 0,9 % розчину натрію хлориду до кінцевої концентрації 0,5–1,0 мг/мл. До 5 мл кожного з 5 розведень стандартного розчину додають 5 мл біуретового реактиву. Одночасно готують контрольну суміш, що складається з 5 мл 0,9 % розчину натрію хлориду і 5 мл біуретового реактиву.

3. Дослідний розчин: до 5 мл культуральної рідини додають 5 мл біуретового реактиву. Всі проби перемішують і залишають на 30 хв. Оптичну густину розчину визначають на ФЕК при довжині хвилі 540 нм в кюветах з товщиною шару 10 мм у порівнянні з контрольним розчином.

За результатами вимірювання оптичної густини стандартних розчинів будують калібрувальний графік або обчислюють вміст білка ( $X$ ) у відсотках за формулою:

$$X = D_{\text{досл}} \cdot \frac{C_{\text{ст}}}{D_{\text{ст}}},$$

- де  $C_{\text{ст}}$  – концентрація білка стандартного розчину, %;  
 $D_{\text{ст}}$  – показник оптичної густини стандартного розчину;  
 $D_{\text{досл}}$  – показник оптичної густини дослідного розчину.



### Завдання 6.

## **ОВОЛОДИТИ МЕТОДИКОЮ ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА У КУЛЬТУРАЛЬНІЙ РІДИНІ**

Кислотним числом ( $I_A$ ) називають кількість калію гідроксиду в мг, необхідне для нейтралізації вільних кислот, які містяться в 1 мл випробуваного розчину.

### Хід роботи

До 10 мл розчину додають 0,5 мл розчину фенолфталеїну. Отриманий розчин титрують 0,1 М розчином калію гідроксиду до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 15 хв. Кислотне число ( $I_A$ ) обчислюють за формулою:

$$I_A = 5,61 \cdot \frac{\hat{A}}{10},$$

- де  $V$  – кількість 0,1 М розчину калію гідроксиду, яка пішла на титрування, мл;  
5,61 – кількість калію гідроксиду, яка відповідає 1 мл 0,1 М калію гідроксиду, мл;  
10 – об'єм дослідного розчину культуральної рідини.



### Контрольні запитання

1. Чим обумовлена наукова назва «чайного гриба» медузоміцет?
2. Які компоненти напою «чайного гриба» корисні для здоров'я людини?

3. Які компоненти поживного середовища є джерелами вуглецю і азоту в процесі культивування «чайного гриба»? Які умови необхідно підтримувати в процесі культивування? При якій тривалості культивування досягаються оптимальні органолептичні показники?
4. Які культури представлені в симбіозі «чайного гриба»?
5. Назвіть продукти метаболізму «чайного гриба», що представляють найбільший інтерес.
6. Яку роль відіграє величина рН у біологічних системах?
7. Що характеризує величина рН у розчині?
8. Яким чином впливає температура на рН розчину?
9. Вкажіть на якому приладі проводять визначення рН.
10. Опишіть електроди, які використовують при вимірюванні рН.
11. Опишіть методику вимірювання рН у водних розчинах.
12. Яка роль буферних розчинів при потенціометрії? Що таке калібрування приладу?
13. Який метод лежить в основі визначення амінного азоту?
14. З якою метою використовують спектроскопію в ультрафіолетовій і видимій областях?
15. Сформулюйте закон Ламберта-Бера і вкажіть які фактори визначають величину екстинкції?
16. Опишіть принципи роботи приладу для вимірювання екстинкції в ультрафіолетовій і видимій областях.
17. Як може впливати стан кювет на результат спектрофотометрії?
18. Який принцип лежить в методиці визначення вітаміну С в культуральній рідині?
19. Опишіть принцип визначення білків за допомогою біуретової реакції.
20. З якою метою використовується стандартний зразок при визначенні білка у культуральній рідині?
21. З якою метою, і яким методом визначають кислотне число?

## Лабораторна робота 2. ОДЕРЖАННЯ, ВИДІЛЕННЯ ТА КОНТРОЛЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ АМІЛАЗИ

**Мета роботи** – провести пошук і виділення найбільш активних продуцентів амілолітичних ферментів з об’єктів навколишнього середовища. Підібрати оптимальне середовища культивування для накопичення максимальної кількості амілази в середовищі. Вивчити процес виділення амілази з культуральної рідини методом осадження ферменту сульфатом амонію.

Роботу проводять в умовах асептики в лабораторії фармацевтичної біотехнології кафедри біотехнології, біофізики і аналітичної хімії НТУ «ХП».

### **Основні завдання:**

1. Виділення мікроорганізмів-продуцентів амілази з об’єктів навколишнього середовища і культивування їх поверхневим способом на щільних поживних середовищах.

2. Підбір середовища культивування для накопичення максимальної кількості амілази.

3. Визначення амілолітичної активності (АС).

4. Виділення амілази з культуральної рідини.

Таблиця 2.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4
<b>Обладнання та матеріали</b>	1. Пробірки скляні	+	+	+	+
	2. Колби плоскодонні 0,25 л, 0,5 л, 1,0 л	+	+	+	+
	3. Піпетки на 0,2 мл, 0,5 мл, 1,0 мл, 5,0 мл, 10,0 мл	+	+	+	+
	4. Мікробіологічні петлі	+	+		
	5. Предметні скельця	+	+		
	6. Водяна баня	+	+	+	+
	7. Термостат із температурою 20–50 °С	+	+	+	+
	8. Мікроскоп	+	+		
	9. Циліндри мірні 0,05 л; 0,25 л; 0,1 л;		+		+
	10. Покровні скельця		+		
	11. Горілки		+		

Закінчення таблиці 2.1

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4
	12. Фотоелектроколориметр 13. Автоклав паровий 14. рН-метр 15. Ваги аналітичні 16. Скляні стакани на 0,25 л 17. Центрифуга 18. Воронка Бюхнера 19. Холодильник побутовий		+	+	+
<b>Сировина</b>	1. Подрібнене сіно 2. Картопля 3. Набір реактивів та барвників для мікробіологічних робіт 4. Борошно різних видів	+			
<b>Реактиви</b>	1. Розчин Люголю 2. М'ясопептоний агар (МПА) із 1 % розчинного крохмалю 3. Вода водопровідна 4. Вода очищена, Р 5. Пробірки із стерильним 0,9 % розчином натрію хлориду 6. Крохмаль, Р 7. Сульфат амонію, Р 8. Калію гідрофосфат, Р 9. Магнію сульфат, Р 10. Натрію хлорид, Р 11. Крейда, Р 12. Сечовина, Р 13. Натрію нітрат, Р 14. Йод кристалічний, Р 15. Кислота оцтова льодяна, Р 16. Натрію оцтовокислий, Р	+			
		+			
		+			
		+			
				+	+
		+	+		
			+	+	+
			+		+
			+		
			+		
			+		
			+		
			+	+	+
					+
					+





## ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Лікарські препарати на основі ферментів різного походження використовуються у багатьох напрямках медицини: гастроентерології, кардіології, пульмонології і т.д. У табл. 2.2 представлені деякі ферментні препарати різного походження, які зареєстровані в Україні.

Таблиця 2.2 – Препарати ферментів, зареєстровані в Україні

Назва препарату	Джерело одержання	Механізм дії	Фармакологічна дія
Іміглюцераза, д/ін.	Рекомбінантна $\beta$ -глюкоцереброзидаза – аналог лізосомальної $\beta$ -глюкоцереброзидази людини	Компенсує функціональну недостатність ферментативної активності $\beta$ -глюкоцереброзидази. Каталізує гідроліз гліколіпіда глюкоцереброзида до глюкози та цераміда, а також попереджає накопичення глюкоцереброзида в макрофагах, тобто перешкоджає утворенню клітин Гоше	Замісна ферментна терапія при хворобі Гоше I типу з клінічно вагомими проявами (анемія, тромбоцитопенія, патологічні зміни кісток)
Панкреатин, <i>per os</i>	Препарат виділяють із підшлункової залози крупного рогатого скота та свиней	Панкреатин містить панкреатичні травні ферменти: ліпазу, $\alpha$ -амілазу, трипсин	Ендокринна недостатність підшлункової залози при хронічному панкреатиті, муковісцидозі, диспептичних проявах та ін.
Хімотрипсин, д/ін.	Препарат виділяють із підшлункової залози	Розщеплює пептидні зв'язки в молекулі білка, які утворені	Трахеїт, бронхіт, пневмонія, абсцес легень та ін.

Продовження таблиці 2.2

Назва препарату	Джерело одержання	Механізм дії	Фармакологічна дія
	крупного рога- того скота	залишками аромати- чних амінокислот, що обумовлює про- тизапальний ефект	
Серрапептаза, табл.	Препарат виді- лено з непато- генної кишкової бактерії <i>Serratia E15</i>	Протеолітичний фе- рмент. Виявляє фіб-ринолітичну, проти- запальну дію. Фер- мент зменшує біль, знижує вивільнення больових амінів із запалених тканин	Спортивні травми, розтягнення, розрив зв'язок, переломи та вивихи. Препарат виявляє протизапа- льну дію та сприяє репаративним про- цесам
Гіалуронідаза, д/ін.	Препарат виді- лено з сім'яників кру- пного рогатого скота	Фермент викликає розкладання гіа- луринової кислоти, основної формоут- ворюючої субстанції сполучної тканини	Застосовують при контрактурі сугло- бів, рубців після опіків та операцій, гематомах, кератиті та ін.
Стрептокіназа, д/ін.	Препарат виді- лено при куль- тивуванні шта- му $\beta$ -гемолітич- ного стрептоко- ку групи С	Фермент має фібри- нолітичну активність	Гострий інфаркт мі- окарду, тромбоз гли- боких вен, гостра масивна тромбоем- болія легеневої ар- терії та ін.
Урокіназа, д/ін.	Препарат отри- мано з культури клітин нирок людини	Фермент виявляє фі- бринолітичну дію, активує глу- і ліз- плазміногени, перет- ворюючи їх на пла- змін, який викликає ферментативне руй- нування фібрину	Гострі тромбози та тромбоемболії роз- галуджень легеневої артерії, гострий ін- фаркт міокарда

Закінчення таблиці 2.2

<b>Назва препарату</b>	<b>Джерело одержання</b>	<b>Механізм дії</b>	<b>Фармакологічна дія</b>
Церулоплаз-мін, д/ін.	Препарат отримано з крові людини	Купрумвмісний багатифункціональний фермент. Підвищує стабільність клітинних мембран за рахунок здатності зупиняти перекисне окислення ліпідів, регулює іонний обмін, стимулює гемопоез	Комплексна терапія онкологічних захворювань, у хворих на анемію, стимуляція гемопоезу та ін.
Цитохром С, д/ін.	Препарат отримано з серцевої тканини коней, крупного рогатого скота	Фермент є каталізатором клітинного дихання, стимулює окисні реакції та активізує метаболізм у тканинах, зменшує гіпоксію в тканинах	Стан тканинної гіпоксії, у тому числі отруєння чадним газом та наркотиками, ішемічний інсульт, хронічна недостатність мозкового кровообігу та ін.
Трипсин, д/ін.	Препарат отримано з підшлункової залози крупного рогатого скота	Виявляє протизапальну та протинабрякову дію	Деструктивні форми туберкульозу легень і шийних лімфатичних вузлів, неспецифічна пневмонія, бронхіт, трахеїт та ін.

Біотехнологічна промисловість випускає великий спектр ферментних препаратів мікробіологічного походження, продуцентами яких є мікроорганізми різних таксономічних груп: бактерії, актиноміцети, гриби, дріжджі та ін. В даний час основна частина ферментів виробляється на основі культур бацил, актиноміцетів та мікроскопічних грибів. Серед мікроорганізмів – продуцентів, які мають високу активність певного ферменту, перевага надається тим, які си-

нтезують переважно один фермент або групу споріднених ферментів. Це пов'язано з тим, що при такому підході досягається найвища ферментативна активність і тоді ці препарати можуть застосовуватися для впливу на індивідуальні компоненти складних субстратів. Крім високої продуктивності і високої швидкості росту до продуцентів ферментів висувається вимога генетичної стабільності за ознакою синтезу ферменту. Нестійкість генетичних ознак може бути причиною частої зміни продуцентів ферментів в умовах промислового виробництва, що тягне за собою значні труднощі, як технологічного характеру, так і зміни характеристик ферментного препарату.



### **Завдання 1.**

### **ВИДІЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ З ОБ'ЄКТІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА І КУЛЬТИВУВАННЯ ЇХ ПОВЕРХНЕВИМ СПОСОБОМ НА ЩІЛЬНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ**

Метою етапу є виділення накопичувальних культур мікроорганізмів-продуцентів амілаз (сінної палички та / або картопляної палички) з об'єктів навколишнього середовища. Провести розсівання отриманої накопичувальної культури на щільні поживні середовища з метою отримання ізольованих колоній і визначення наявності амілолітичної активності у виділених культур мікроорганізмів.

### **Хід роботи**

**1. Отримання накопичувальної культури сінної палички (*Bacillus subtilis*).**

Дрібно нарізане сіно (3–5 г) заливають 20–25 мл теплої водопровідної води (35–40 °С), ретельно перемішують і настоюють протягом 30–35 хвилин. Отриманий таким чином екстракт фільтрують або зливають у колбу, закриту ватно-марлевою пробкою, і витримують на киплячій водяній бані протягом 15 хвилин. Отриману накопичувальну культуру сінної палички використовують як посівний матеріал.

**2. Отримання накопичувальної культури картопляної палички (*Bacillus subtilis*, var. *Mesentericus*).**

Картоплю ретельно очищають і нарізають дрібними скибочками. Нарізану картоплю (3–5 г) заливають 20–25 мл теплої водопровідної води (35–40 °С),

ретельно перемішують і настоюють протягом 30–35 хвилин. Отриманий таким чином екстракт фільтрують або зливають у колбу, закриту ватно-марлевою пробкою, і витримують на киплячій водяній бані протягом 15 хвилин. Отриману накопичувальну культуру картопляної палички використовують як посівний матеріал.

### ***3. Визначення морфологічних і культуральних ознак отриманих культур.***

Для отримання ізольованих колоній мікроорганізмів-продуцентів амілаз отримані накопичувальні культури картопляної і сінної палички розводять стерильним 0,9 % розчином натрію хлориду в 10–1000 разів. З отриманих таким чином розведень проводять висів 0,5–1,0 мл відповідного розведення на щільне поживне середовище (МПА, що містить розчинний крохмаль). Після посіву чашки поміщають в термостат при температурі 30 °С на 2–3 доби для утворення колоній мікроорганізмів. Після утворення колоній визначають які з отриманих культур (штамів) мають найвищу амілолітичну активність. Для цього поверхню середовища заливають розчином Люголю. Крохмаль, що міститься в середовищі, забарвлюється в синій колір. Якщо ж мікроорганізм має амілолітичну активність, то навколо відповідної колонії утворюються зони просвітління середовища. Чим більше ширина зони, тим вище амілолітичні властивості культури. Після вибору культури з найвищими амілолітичними властивостями проводиться опис її морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей (форма, розмір, наявність і розташування спор, наявність капсул, рухливість джгутиків, наявність запасних речовин, опис колоній).

### ***4. Розсівання отриманих накопичувальних культур продуцентів.***

Для отримання необхідного посівного матеріалу для подальшої роботи необхідно провести розсівання обраної культури мікроорганізмів з описаних колоній петлею на поверхню в пробірки з відповідним поживним середовищем (МПА з крохмалем). Після посіву пробірки поміщають у термостат при температурі 30 °С на 2–3 доби для отримання посівного матеріалу.

Отримані дані заносяться в таблицю: властивості виділеної культури мікроорганізмів; характеристика поживного середовища; вік культури; опис виділеної культури мікроорганізмів; характер на щільному поживному середовищі (при описі колоній відзначають такі ознаки: форма, розмір, колір, поверхня, профіль, край, консистенція); морфологічні ознаки культури (форма і розміри клітин, з'єднання клітин, рухливість, розташування і кількість джгутиків, вид

спороутворення і утворення капсул (при наявності), запасні речовини і вид, забарвлення за Грамом, кислотостійкість).



## **Завдання 2.**

### ***ПІДБІР СЕРЕДОВИЩА КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ НАКОПИЧЕННЯ МАКСИМАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ АМІЛАЗИ***

Метою етапу є підбір компонентів середовища культивування (джерел вуглецю і азоту) для накопичення максимальної кількості амілази в середовищі.

#### ***Приготування розчинів:***

1. *1,0 % розчин крохмалю.* 1,0 г крохмалю розчинного розтирають у порошок з 5 мл води. Суміш повільно при постійному помішуванні вливають в 100 мл окропу.

2. *Ацетатний буфер, рН 4,7.* У 50 мл води розчиняють 5,4 г натрію ацетату. Додають 2,4 г кислоти оцтової льодяної, доводять водою до об'єму 100 мл. Якщо необхідно, доводять рН.

3. *Основний розчин йоду.* У воді розчиняють 12,7 г йоду і 20 г калію йодиду і доводять водою об'єм розчину до 1000 мл. Зберігають в захищеному від світла місці.

4. *Робочий розчин йоду.* До 10 мл 0,05 М розчину йоду додають 0,6 г калію йодиду і доводять об'єм розчину водою до 100 мл. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

## **Хід роботи**

### ***1. Підготовка поживного середовища і ємності для культивування.***

#### ***Вибір джерела вуглецю.***

Як джерело вуглецю для вирощування продуцентів амілаз можуть використовуватися різноманітні крохмалевмісні субстрати: крохмаль, борошно різних видів (пшеничне, кукурудзяне, житнє та ін.). Внесення субстрату здійснюється таким чином, щоб вміст крохмалю (з урахуванням умовної крохмалистості сировини і вологості субстрату) в середньому становило близько 1,0 %. Варіанти можливих поживних середовищ з обраним джерелом вуглецю вказані в табл. 2.3.

Таблиця 2.3 – Варіанти поживних середовищ з обраним джерелом вуглецю для *Bacillus*

Варіанти	Компоненти поживного середовища	Вміст компоненту, г/л
I	Крохмаль	10
	Сульфат амонію	2
	Гідрофосфат калію	1
	Сульфат магнію	1
	Натрію хлорид	1
	Крейда	3
II	Борошно пшеничне	10
	Сульфат амонію	2
	Гідрофосфат калію	1
	Сульфат магнію	1
	Натрію хлорид	1
	Крейда	3
III	Борошно кукурудзяне	10
	Сульфат амонію	2
	Гідрофосфат калію	1
	Сульфат магнію	1
	Натрію хлорид	1
	Крейда	3

Для приготування поживного середовища крохмаль або борошно попередньо змішуються у співвідношенні 1 : 10 з холодною водою при постійному перемішуванні і заварюються на киплячій водній бані. Потім у підготовлений таким чином розчин крохмалевмісної сировини вносять розчин, що містить солі в необхідних концентраціях і все ретельно перемішують. Підготовлене поживне середовище після охолодження до 40–45 °С при перемішуванні відміряють і розливають у колби для ферментації. У колби об'ємом 250 мл розливають 70–100 мл середовища; к колби об'ємом 100 мл розливають по 20–25 мл середовища. Колби закривають ватно-марлевими пробками і паперовими ковпачками поміщають в автоклав для стерилізації. Також стерилізують загорнуті в папір піпетки на 2 мл, закриті з широкого кінця ватними тампонами і пробірки з 10 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. Стерилізацію проводять протягом 30 хв при температурі  $121 \pm 2$  °С.

## **2. Посів культури на поживне середовище.**

Колби з поживним середовищем виймають з автоклава і охолоджують до температури 30–35 °С. Засів поживного середовища виробляють, дотримуючись правил стерильності. Для цього в пробірку, що містить посівний матеріал, вносять 10 мл стерильного 0,9 % розчину натрію хлориду і ретельно перемішують для одержання суспензії мікроорганізмів. Потім 2 мл суспензії бактерій стерильно переносять в колбу з поживним середовищем (на 20–25 мл середовища). Якщо об'єм середовища більше, то об'єм суспензії бактерій відповідно збільшують. Вміст колб ретельно перемішують, колби закривають і підписують. Колби встановлюють на качалках і закріплюють. За відсутності качалок можливо багаторазове перемішування вручну. Температура культивування – 30 °С, тривалість культивування – 24 години.

## **3. Відділення біомаси і твердої фази середовища.**

Для відділення біомаси бактерій і твердої фази середовища використовують фільтрування або центрифугування. При фільтруванні, вміст колби фільтрують під вакуумом через воронку Бюхнера, використовуючи спеціальні бактеріальні фільтри. В отриманій культурі проводять визначення амілолітичної активності.

## **4. Вибір джерела азоту.**

Після вибору найбільш прийняттого джерела вуглецю розглядають різні джерела азоту і те, як вони впливають на вихід цільового ферменту. Як джерело азоту для вирощування продуцентів амілаз можуть використовуватися різноманітні органічні та неорганічні субстрати – солі, пептони, амінокислоти, сечовина. Варіанти середовищ з обраним джерелом азоту вказані в табл. 2.4.

Таблиця 2.4 – Варіанти поживних середовищ з обраним джерелом азоту для *Bacillus*

<b>Варіанти</b>	<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Вміст компоненту, г/л</b>
<b>I</b>	Крохмаль (або інше джерело вуглецю у оптимальній концентрації)	10
	Сульфат амонію	2
	Гідрофосфат каїю	1
	Сульфат магні.	1
	Натрію хлорид	1
	Крейда	3



Закінчення таблиці 2.4

Варіанти	Компоненти поживного середовища	Вміст компоненту, г/л
II	Крохмаль (або інше джерело вуглецю у оптимальній концентрації)	10
	Сечовина	2
	Гідрофосфат калію	1
	Сульфат магнію	1
	Натрію хлорид	1
	Крейда	3
III	Крохмаль (або інше джерело вуглецю у оптимальній концентрації)	10
	Нітрат натрію	2 (3)
	Гідрофосфат калію	1
	Сульфат магнію	1
	Натрію хлорид	1
	Крейда	3



### Завдання 3.

### ***ВИЗНАЧЕННЯ АМІЛОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ***

Визначення проводять колориметричним методом. Метод заснований на гідролізі крохмалю ферментами амілолітичного комплексу до декстринів різної молекулярної маси.

Амілолітична активність характеризує здатність амілолітичних ферментів каталізувати гідроліз крохмалю до декстринів різної молекулярної маси і виражається числом одиниць зазначених ферментів в одному грамі препарату. За одиницю активності амілолітичних ферментів прийнято таке число, яке в суворо визначених умовах температури, рН та часу дії каталізує до декстринів різної молекулярної маси 1 грам розчинного крохмалю або 30 % від введеної у реакцію речовини.

### **Хід роботи**

У дві пробірки діаметром 2 см і заввишки 18 см доливають по 10 мл 1 %-вого розчину крохмалю і поміщають пробірки на водяну баню або термостат при температурі  $30 \pm 0,2$  °С на 5–10 хвилин. Потім, не виймаючи пробірки з

термостата, доливають в першу пробірку 5 мл води (контрольна проба), в другу 5 мл культуральної рідини – дослідна проба (розчин досліджуваного ферменту). Суміш інтенсивно перемішують і витримують в термостаті 10 хв. Потім з контрольної та дослідної пробірки відбирають по 0,1 мл розчину і переносять їх в колби з 10 мл робочого розчину йоду. Вміст колб перемішують. Отримані розчини набувають якого забарвлення: контрольний – синього, дослідний – фіолетового з різною інтенсивністю в залежності від кількості негідролізованого крохмалю. Безпосередньо після змішування розчинів визначають їх оптичну густину на ФЕК, використовуючи світлофільтр з максимумом світлопропускання при  $\lambda = 656$  нм (650–670 нм), користуючись кюветами з товщиною поглинаючого світла 0,5–1 см. Контрольним розчином при колориметрії досліджуваних розчинів є вода. Оптична густина контрольного розчину ( $D_1$ ) відповідає кількості вихідного крохмалю в субстраті. Оптична густина дослідного розчину ( $D_2$ ) відповідає кількості крохмалю, що залишився після дії ферменту. Різниця між показниками оптичної густини розчинів відповідає кількості гідролізованого крохмалю у субстраті.

Кількість гідролізованого крохмалю у субстраті (г) визначають за формулою:

$$C = 0,1 \cdot \frac{D_1 - D_2}{D_1},$$

де 0,1 – кількість крохмалю, взятого на дослід як субстрат, г.

Якщо кількість гідролізованого крохмалю менше 0,02 г або більше 0,07 г, то випробування повторюють. Для цього при приготуванні робочого розчину ферменту беруть більшу або меншу кількість вихідного розчину для розведення. Якщо в результаті кількість перетвореного крохмалю знаходиться у зазначених межах, то отримані дані використовують для розрахунку амілолітичної активності.

Амілолітичну активність (АС, од/мл) препаратів бактеріального походження визначають за формулою:

$$AC = (5,885 \cdot C + 0,001671) \cdot \frac{1000}{n},$$

де 5,885 і 0,001671 – коефіцієнти розрахункового рівняння, отримані при математичній обробці експериментальних даних залежності кількості гідролізованого крохмалю від кількості ферменту, взятого для випробування (у коефіцієнти введено множник для перерахунку на 1 годину дії ферменту);

C – кількість гідролізованого крохмалю, г;

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграмів у грами;

n – кількість ферментного препарату, узятая для випробування, мг або мл.

Дані, отримані при дослідженні амілолітичної активності, заносяться до таблиці 2.5

Таблиця 2.5 – Отримані дані

Культура бактерій	Джерело вуглецю	Джерело азоту	Амілолітична активність культуральної рідини, АС, од/мл



#### Завдання 4.

#### ***ВИДІЛЕННЯ АМІЛАЗИ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ***

Метою етапу є виділення амілази з культуральної рідини методом осадження ферменту сульфатом амонію. За отриманими даними визначити, які концентрації сульфату амонію викликають випадання в осад цільового ферменту.

#### ***Приготування розчинів:***

1. *1,0 % розчин крохмалю.* 1,0 г крохмалю розчинного розтирають у порошок з 5 мл води. Суміш повільно при постійному помішуванні вливають в 100 мл окропу.

2. *Ацетатний буфер, рН 4,7.* У 50 мл води розчиняють 5,4 г натрію ацетату. Додають 2,4 г кислоти оцтової льодяної, доводять водою до об'єму 100 мл. Якщо необхідно, доводять рН.

3. *Основний розчин йоду.* У воді розчиняють 12,7 г йоду і 20 г калію йодиду і доводять водою об'єм розчину до 1000 мл. Зберігають в захищеному від світла місці.

4. *Робочий розчин йоду.* До 10 мл 0,05 М розчину йоду додають 0,6 г калію йодиду і доводять об'єм розчину водою до 100 мл. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

5. *Насичений розчин сульфату амонію.* У колбу вносять 400 мл води очищеної і додають розтертий у ступці порошок сульфату амонію до припинення його розчинення.

### **Хід роботи**

Висолювання білків з культуральної рідини. В ряд склянок поміщають по 50 мл культуральної рідини, попередньо звільненої від клітин мікроорганізмів, що містить амілазу. До вмісту першої склянки по краплях додають 150 мл насиченого розчину сульфату амонію і залишають у спокої для випадіння осаду. До вмісту другої склянки по краплях додають 100 мл насиченого розчину сульфату амонію і залишають у спокої для випадіння осаду. До вмісту третьої склянки по краплях додають 50 мл насиченого розчину сульфату амонію і залишають у спокої для випадіння осаду. До вмісту четвертої склянки по краплях додають 25 мл насиченого розчину сульфату амонію і залишають у спокої для випадіння осаду. Всі колби витримують при кімнатній температурі. Тривалість висолювання – 1 година. Для прискорення процесу можливе витримання склянок з матеріалом у холодильнику при температурі 4–8 °С.

Після формування осаду його відокремлюють шляхом центрифугування при 3–8 тис.об./хв 20–40 хвилин. Всі отримані осади розчиняють у 50 мл води очищеної і визначають активність амілази в отриманих розчинах з використанням наведеної вище методики. Визначити при якій концентрації сульфату амонію спостерігається найбільший вихід амілази. Зробити висновки по виконаній роботі.



### **Контрольні запитання**

1. Які основні методи виділення ферментів?
2. Які Вам відомі фармацевтичні препарати, що містять ферменти? В яких випадках використовують в медицині ферментні препарати?

3. З якою метою проводять отримання «накопичувальної культури» бактерій?
4. Опишіть методики отримання накопичувальної культури сінної палички *Bacillus subtilis*.
5. Опишіть методики отримання накопичувальної культури картопляної палички *Bacillus subtilis var. Mesentericus*.
6. Які морфологічні та культуральні ознаки визначають при культивуванні бактерій?
7. Які принципи підбору складу культурального середовища?
8. Охарактеризуйте компонентний склад поживних середовищ для вирощування *Bacillus*.
9. Опишіть режими засіву і культивування бактерій.
10. Яким чином проводять вибір джерела азоту для поживного середовища?
11. Охарактеризуйте фермент амілазу і амілолітичну активність.
12. Яким методом визначають амілолітичну активність ферменту?
13. Наведіть формулу розрахунку для визначення кількості гідролізованого крохмалю.
14. Наведіть формулу розрахунку для визначення амілолітичної активності.
15. Опишіть метод виділення амілази з культуральної рідини.

### Лабораторна робота 3. ОДЕРЖАННЯ ТА КОНТРОЛЬ ФОСФОЛІПІДНОГО КОМПЛЕКСУ, ЗБАГАЧЕНОГО ФОСФАТИДИЛХОЛІНОМ (ЛЕЦИТИНОМ) ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У СКЛАДІ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

**Мета роботи** – ознайомитися з принципами роботи при виділенні фосфоліпідних компонентів біологічних мембран. Оволодіти методиками контролю фосфоліпідних субстанцій, що використовуються для отримання фармацевтичних препаратів на основі ліпідів: емульсій, суспензій і ліпосом.

**Основні завдання:**

1. Виділення фосфоліпідного комплексу, збагаченого фосфатидилхолін (лецитином) для використання в складі нанобіотехнологічних препаратів.
2. Оволодіти методиками контролю фосфоліпідних компонентів.

Таблиця 3.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4	5
<b>Обладнання та матеріали</b>	1. Центрифуга з пробірками	+				+
	2. Ваги аналітичні	+			+	
	3. Спектрофотометр	+		+		+
	4. Плитка електрична	+				+
	5. Мішалка магнітна	+				
	6. Насос водоструменевий	+				
	7. Шафа сушильна (50–200 °С)	+	+		+	+
	8. Холодильник побутовий	+				
	9. Роторний випарювач	+				
	10. Баня водяна	+				+
	11. Воронка Бюхнера	+				
	12. Колба Бунзена	+				
	13. Піпетки 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл	+	+	+	+	+
	14. Циліндри мірні	+	+			
	15. Колби об'ємом 25 мл, 50 мл, 100 мл	+		+		+
	16. Бюкси скляні	+			+	
	17. Воронки конусні	+				+

Закінчення таблиці 3.1

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4	5
	18. Воронка ділильна 19. Камера для висхідної хроматографії 20. Папір фільтрувальний 21. Колби К'ельдаля	+	+			+
<b>Сировина</b>	1. Яйця курячі	+				
<b>Реактиви</b>	1. Ацетон, Р 2. Хлороформ, Р 3. Етанол, Р 4. Метанол, Р 5. Кадмій хлористий, Р 6. Натрій сірчаноокислий, Р 7. Вода очищена, Р 8. Йод кристалічний, Р 9. Силікагель для хроматографії, Р 10. Перхлорна кислота, Р 11. Амонію молібдат, Р 12. Кислота аскорбінова, Р	+	+	+		+



### **ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ**

Останнім часом у багатьох дослідницьких центрах проводяться роботи фундаментального і прикладного характеру, що спрямовані на всебічне вивчення великої групи природних біологічно активних сполук під загальною назвою «фосфоліпіди». Уявлення, що ґрунтуються на результатах структурно-функціональних досліджень, відводять їм та їх надмолекулярним клітинним утворенням – біологічним мембранам – найважливішу роль у функціонуванні біохімічних механізмів, що визначають фізіологічний стан клітини, її реакції і взаємодію як із сусідніми клітинами, так і з факторами навколишнього середовища. І, як наслідок, важлива роль відводиться вивченню таких напрямів медичної біотехнології, пов'язаних з роллю фосфоліпідів, як біологія, біохімія, біофізика, імунологія, фізіологія, фармакологія та ін. У прикладному аспекті це стало основою того, що певні типи фосфоліпідів, їх фрагменти і модифіковані

синтетичні аналоги привертають увагу дослідників як перспективне джерело для конструювання діагностичних і лікарських препаратів, а також їх використання у практичній медицині.

Питання використання препаратів і біологічно активних добавок, що містять фосфоліпіди для лікування лікарських поразок в організмі хворого, сьогодні стають дуже актуальними. Можливість використання таких препаратів передусім пов'язана з унікальністю структури фосфоліпідів і їх роллю в біологічних мембранах.

Значимість препаратів, що містять фосфоліпіди, визначається їх роллю у біологічних мембранах:

- гальмування процесів перекисного окислення ліпідів;
- прискорення регенерації пошкоджених клітинних мембран, наприклад, гепатоцитів або нервових клітин;
- використання фосфоліпідів як «будівельного» матеріалу для пошкоджених органів;
- зміна процесів метаболізму.

Фосфоліпіди є спеціалізованими ліпідами, що входять до складу цитоплазматичної мембрани клітин і її органел (мітохондрій, ендоплазматичного ретикулу та ін.). Фосфоліпіди називають есенціальними, маючи на увазі їх незамінність при функціонуванні клітин в організмі. Говорячи про роль фосфоліпідів у функціонуванні біологічних мембран, слід зазначити, що клітинні мембрани, включаючи плазматичну мембрану та внутрішні мембрани еукаріотичних клітин, є ансамблем фосфоліпідних і білкових молекул. Як показано на рис. 3.1, вміст інших компонентів становить менше 5 %.

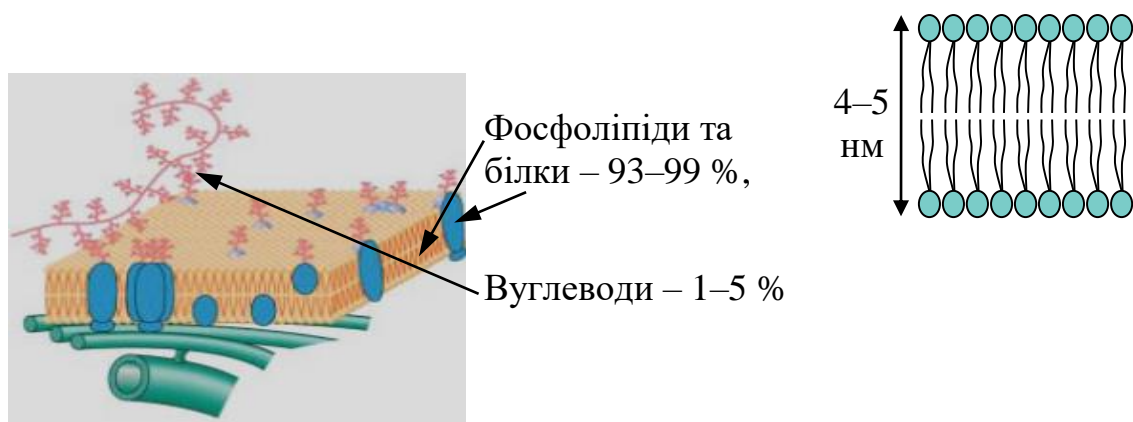


Рисунок 3.1 – Структура біологічної мембрани – основні компоненти мембран



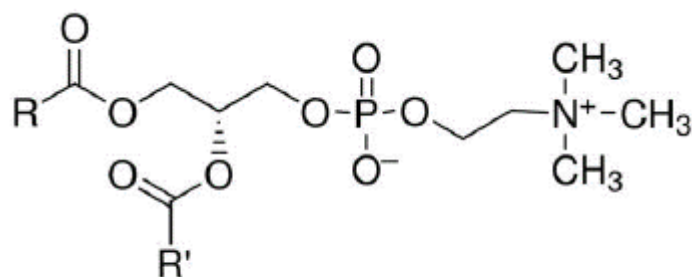
Оскільки фосфоліпиди є основним структурним компонентом всіх клітинних мембран, то від них безпосередньо залежать численні функції клітини. Нижче наведені найважливіші біологічні функції.

Структурна функція – суміш фосфоліпідів має утворювати стабільний бішар для функціонування мембранних білків (до таких фосфоліпідів відносяться фосфатидилхолін, фосфатидилгліцерин, сфінгомієлін і ряд гліколіпідів), але в той же час у мембрані присутні деякі фосфоліпиди, які здатні до утворення небіслойних структур (фосфатидилетаноламін, кардіоліпін, фосфатидна кислота і основний метаболіт фосфоліпідів – діацилгліцерин). Утворення таких сильно викривлених ділянок мембрани необхідно є при контакті між мембранами (процес злиття клітин) або при зв'язуванні певних білків у мембрані, що забезпечує існування мембрани у функціонально активному стані.

Завдання отримання фосфоліпідів в препаративних кількостях вирішується виділенням їх із природних об'єктів на основі біотехнологічних прийомів. Цей підхід проілюстровано схемою, зображеної на рис. 3.2. На цій схемі зображено виділення фосфатидилхоліну з яєчного жовтку.

Фосфатидилхолін яєчний (рис. 3.3). має молекулярну масу 770,123.

Брутто формула:  $C_{42}H_{82}NO_8P$ .



R, R' = Залишки жирних кислот

Рисунок 3.3 – Структурна формула яєчного фосфатидилхоліну

Фосфатидилхолін яєчний являє собою пористі агломерати білувато-жовтуватого кольору, у воді утворює емульсію; розчиняється в етанолі та хлороформі.

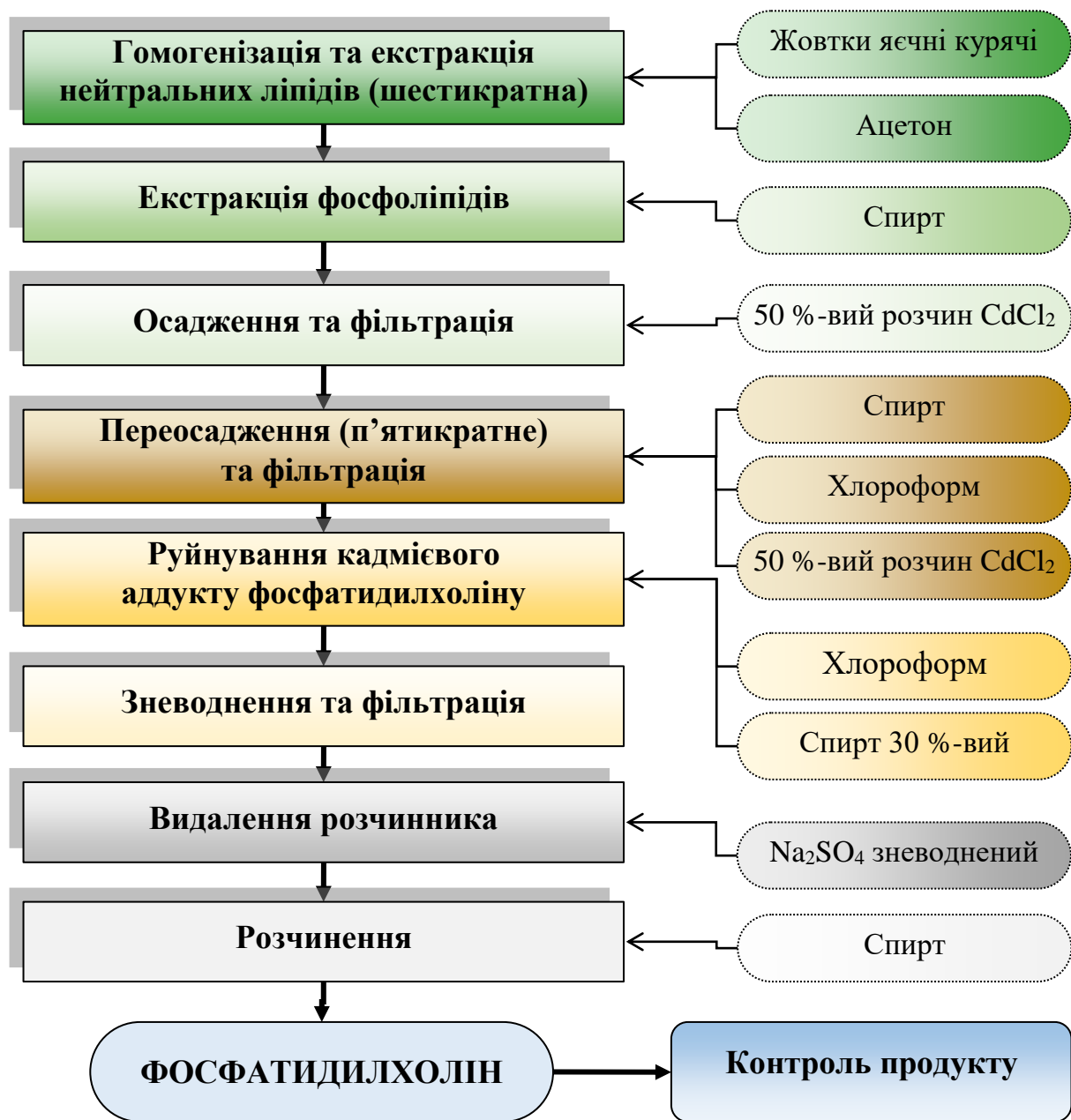


Рисунок 3.2 – Принципова схема виділення та очистка фосфатидилхоліну

Проведено роботи, спрямовані на створення технологій отримання фосфоліпідних субстанцій для конструювання діагностичних і лікарських препаратів. Найбільша кількість (понад 50) фосфоліпідвмісних препаратів представлено ліпосомами. Ліпосоми являють собою нанорозмірні колоїдні сфери, які складаються з фосфоліпідного шару, всередині якого знаходиться активний лікарський засіб (рис. 3.4).

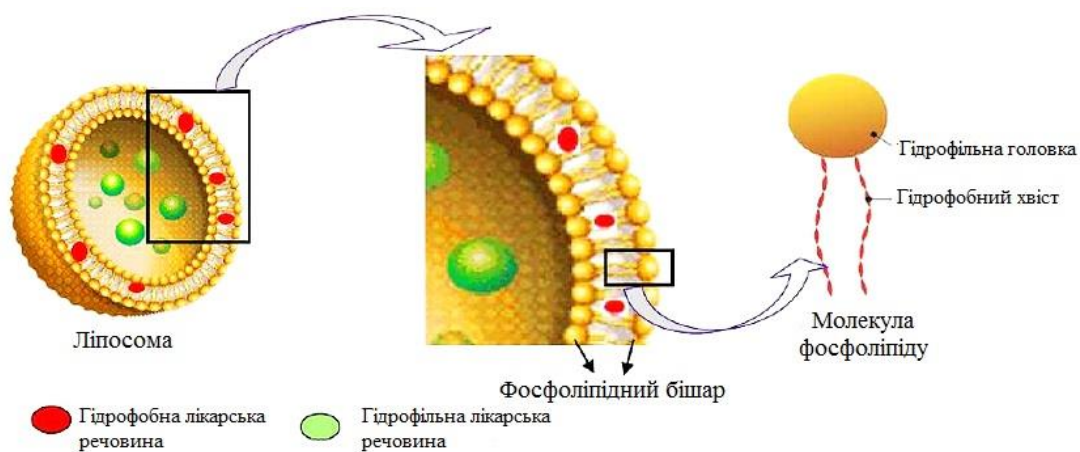


Рисунок 3.4 – Схематична будова ліпосомального лікарського засобу

Створення і застосування ліпосом – штучних сферичних мембранних конструкцій на основі ліпідів є одним із перспективних напрямків сучасної біонанотехнології. Ліпосоми вперше були отримані Бенгхемом при дослідженні ролі фосфоліпідів у процесі згортання крові. Ліпосоми можна «навантажити» різними лікарськими засобами, серед яких вітаміни, гормони, ферменти, цитостатики та інші сполуки. Введені в організм ліпосоми, навантажені лікарським засобом, взаємодіють із мембранами клітин, зв'язуються з ними і передають клітині лікарську речовину. Використання ліпосом у медицині за останні 30 років знайшло широке застосування, як в лікувальних, так і в діагностичних цілях.

Ліпосомальні препарати мають ряд переваг:

- пролонгують дію введеного в організм лікарського препарату;
- змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, істотно підвищуючи їх фармакологічну ефективність;
- захищають лікарські речовини від деградації;
- захищають здорові клітини і патологічні органи від токсичної дії лікарських препаратів;
- здатні збільшувати біодоступність лікарських субстанцій.

Необхідно також зазначити високу ефективність ліпосом при використанні їх як ад'ювантів у складі вакцин. Ліпосомальні форми лікарських препаратів на сьогоднішній день є єдиним реальним прикладом застосування нанопрепаратів в медицині.



### **Завдання 1.**

## **ВИДІЛЕННЯ ФОСФОЛІПІДНОГО КОМПЛЕКСУ, ЗБАГАЧЕНОГО ФОСФАТИДИЛХОЛІНОМ (ЛЕЦИТИНОМ), ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У СКЛАДІ НАНОБІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Виділення цільового продукту – фосфатидилхоліну – з тваринних тканин проводять шляхом його екстракції та осадження. У даній роботі для виділення фосфатидилхоліну будуть використовуватися методи екстракції переосадженням органічними розчинниками: ацетоном, етанолом, хлороформом. Виділення фосфоліпідного комплексу проводять за схемою, зображеною на рис. 3.2.

Екстракція – це процес виборчого виділення одного або декількох речовин за допомогою рідкого розчинника. Розрізняють твердо-рідинну і рідинно-рідинну типи екстракції. При твердо-рідинній екстракції речовина (ліпіди) з твердої фази переходить у рідку; при рідинно-рідинній – з однієї рідини в іншу, наприклад, у запропонованій методиці ліпідний компонент із спиртового розчину кадмію хлористого переходять у водну фазу.

В даному випадку спочатку нейтральні ліпіди екстрагують ацетоном, а фосфоліпіди етанолом. Ефективність екстракції може бути підвищена за рахунок повторної екстракції свіжим екстрагентом, вибором оптимального розчинника. При екстракції для зниження втрат цільового продукту можна використовувати розчинники зі зниженою температурою. Так, наприклад, використовуючи ацетон при температурі мінус 10–15 °С можна значно знизити втрати фосфоліпідів, які мають низьку розчинність при низьких температурах.

### ***Приготування розчинів:***

1. *Приготування 50 %-вого розчину кадмію хлориду.* У дозованій тарі зважують 11 г кадмію хлориду, поміщають у ємність об'ємом 50 мл, доливають 11 мл води і перемішують до повного розчинення. Отриманий розчин фільтрують на воронці через паперовий фільтр у флакон об'ємом 50 мл і перекривають пробкою. На флакон наклеюють етикетку, на якій вказано: назва розчину, кількість, концентрація і дата приготування. Розчин готують перед використанням.

2. *Приготування 30 %-вого розчину етилового спирту.* У 2 бутлі об'ємом 1,0 л доливають по 745 мл води, а потім додають по 335 мл спирту етилового. Отриманий розчин перемішують і визначають концентрацію спирту етилового. Вона повинна бути  $30 \pm 2$  %. Визначення проводять за допомогою спиртоміра. Бутель перекривають пробкою. На бутель наклеюють етикетку, на якій вказано:

назва розчину, концентрація і дата приготування. Розчин готують перед використанням.

## **Хід роботи**

### ***1. Зневоднення жовтків і екстракція нейтральних ліпідів.***

Наявність у вихідному матеріалі води ускладнює подальшу екстракцію ліпідних компонентів. Так в яєчному жовтку присутній високий вміст нейтральних ліпідів: вільних жирних кислот, холестерину, гліцеридів та ін. Необхідно провести їх екстракцію. Оптимальним екстрагентом є абсолютний ацетон, обробка яким видаляє як воду, так і нейтральні ліпіди.

Яйця (в кількості 2-х штук) розбивають, відокремлюючи білки від жовтків вручну. Жовтки збирають у ємність, білки збирають окремо. До жовтків доливають ацетон в кількості 40 мл, попередньо охолоджений до температури мінус 10–15 °С. Включають мішалку і подрібнюють жовтки протягом 3–4 хвилин при температурі від мінус 5 °С до мінус 10 °С і швидкості обертання 500–600 об./хв. Отриману суміш фільтрують на воронці Бюхнера через фільтрувальний папір за допомогою вакууму. Папір перед фільтрацією змочують ацетоном. Жовтки на фільтрі промивають ацетоном в кінці фільтрації. Витрата ацетону для промивання становить 5 мл на кожну фільтрацію. Зневоднені жовтки знову поміщають в ємність, додають охолоджений ацетон (40 мл) і повторюють подрібнення. Процес видалення нейтральних ліпідів повторюють ще 5 разів.

### ***2. Екстрагування фосфоліпідів.***

Знежирені жовтки завантажують в ємність і доливають спирт етиловий (96,5 %) в кількості 100 мл. Проводять перемішування суміші при кімнатній температурі протягом 1,5 години при 500–600 об./хв. Суміш фільтрують на воронці Бюхнера через фільтрувальний папір, попередньо змочений етиловим спиртом (5 мл). Фільтрат збирають у ємність. На ємність наклеюють етикетки з позначенням назви продукту, дати.

Ємність з фільтратом поміщають у холодильник і охолоджують до температури  $6 \pm 2$  °С.

### ***3. Отримання очищеного концентрованого хлороформного розчину суміші фосфоліпідів.***

У ємність при постійному помішуванні доливають 2,6 мл 50 %-вого розчину кадмію хлориду, попередньо охолодженого в холодильнику до температури  $6 \pm 2$  °С. Додавання розчину кадмію хлориду ведуть повільно при перемішу-

ванні. Отриману суміш поміщають у холодильник при температурі  $6 \pm 2$  °C на 1–2 години для повного осадження фосфоліпідів.

Осад відокремлюють на центрифугі при температурі  $0 \pm 2$  °C, 2500 об./хв. протягом 10 хвилин.

Осад з центрифужних пробірок змивають 5 мл хлороформу в ємність і направляють на переосадження.

У ємність з осадом фосфоліпідів, при перемішуванні, доливають 12,0 мл хлороформу. Суміш перемішують протягом 2–3 хвилин до повного розчинення. Потім в ємність доливають суміш, яка містить 100 мл спирту етилового, 1,6 мл 50 % -вого розчину кадмію хлориду, при постійному перемішуванні.

Суміш поміщають у холодильник і витримують при температурі мінус  $10 \pm 2$  °C протягом 20 хвилин. Осад відокремлюють на центрифугі при температурі  $0 \pm 2$  °C, 2500 об / хв, протягом 15–20 хв.

Осад з центрифужних пробірок змивають хлороформом, і процес повторюють ще 2 рази. У ємність з осадом фосфоліпідів додають 24 мл хлороформу і перемішують протягом 2–3 хвилин до повного розчинення осаду. Доливають у кожен ємність 24 мл 30 %-вого розчину етилового спирту при перемішуванні. Отриману суміш розділяють на ділильній воронці. Нижній шар (хлороформний розчин) фосфоліпідів поміщають у ємність, а верхній шар (водно-спиртовий) видаляють. Хлороформний розчин ліпідів знову обробляють 30 %-вим розчином етилового спирту. Для кращого очищення ліпідів дану операцію повторюють ще 4–5 разів. Закінченням відмивання хлороформного розчину лецитину від іонів  $\text{Cl}^-$  є негативна реакція на іон  $\text{Cl}^-$  у водно-спиртовому екстракті. Після очищення розчин ліпідів відразу передають на зневоднення.

#### **4. Отримання очищеного комплексу фосфоліпідів.**

*4.1 Зневоднення хлороформного розчину.* У ємність з хлороформним розчином фосфоліпідів додають зважений на вагах сірчаноокислий натрій – 20 г.

*Примітка:* натрій сірчаноокислий перед застосуванням прокалюють у сухожарові шафі при температурі 180–200 °C протягом 2-х годин. Зневоднений натрій сірчаноокислий використовують охолоджений до кімнатної температури.

Розчин фосфоліпідів з натрієм сірчаноокислим перемішують протягом п'яти хвилин, закривають ємність пробкою і поміщають у холодильник при температурі  $6 \pm 2$  °C не менше ніж на 18 годин.

Осад солі відфільтровують на воронці з фільтрувальної папером. Папір попередньо змочують хлороформом (5 мл). Фільтрат поміщають в ємність місткістю 50 мл.

4.2 *Отримання фосфоліпідного комплексу.* Хлороформний розчин фосфоліпідів поміщають у колбу ротаційного випарника і видаляють хлороформ при температурі  $37 \pm 1$  °С при зниженому тиску 0,08-0,1 МПа до постійної маси. До масла фосфоліпідів доливають 10 мл спирту. Вміст колби перемішують до повного розчинення ліпідів.

На ємність наклеюють етикетку, на якій вказують назву, номер серії, кількість, дату. З ємності відбирають контрольну пробу, і продукт зберігають у холодильнику при температурі мінус  $15 \pm 5$  °С. Продукт повинен бути прозорим і безбарвним.



## **Завдання 2.**

### ***ХРОМАТОГРАФІЯ У ТОНКОМУ ШАРІ СИЛІКАГЕЛЮ***

Для визначення фракційного складу фосфоліпідів, їх автентичності та вмісту домішок можна використовувати методи хроматографії: тонкошарову хроматографію і високоефективну рідинну хроматографію. Для визначення фракційного складу фосфоліпідів і їх ідентифікації найчастіше використовується метод тонкошарової хроматографії у тонкому шарі сорбенту, наприклад, силікагелю.

### **Хід роботи**

На хроматограмі повинні бути наявні три плями жовтого кольору: фосфатидилхоліну (лецитину) з  $R_f (0,27 \pm 0,03)$ , фосфатидилетаноламіну з  $R_f (0,43 \pm 0,03)$ , лізолецитну з  $R_f (0,13 \pm 0,03)$ . Допускається наявність четвертої плями. Ідентифікацію фосфатидилхоліну необхідно проводити, використовуючи стандартні зразки фосфатидилхоліну (лецитину), фосфатидилетаноламіну, лізолецитину.

Визначення проводиться методом хроматографії у тонкому шарі силікагелю: 0,05 мл 1,0 %-вого розчину досліджуваних ліпідів за допомогою мікропіпетки наносять у вигляді смужки довжиною 5–7 мм і шириною 1–2 мм на лінію старту пластинки розміром 120 x 90 мм із закріпленим шаром силікагелю. Аналогічно наносять 1,0 %-ві розчини стандартних зразків.

Пластинку з нанесеною пробою висушують на повітрі протягом 5–6 хвилин, після чого поміщають в камеру висотою 190–220 мм, діаметром 150–200 мм, яка містить суміш розчинників: хлороформ : метанол : вода у співвід-

ношенні 65: 25: 4 і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинника дійде до краю пластини, її виймають з камери, висушують на повітрі протягом 15–20 хвилин. Хроматограму проявляють парами йоду протягом 2–5 хвилин.

*Примітки:*

1) За відсутності комерційних пластин для тонкошарової хроматографії («Silufol», «Merk» та ін.) можливе приготування пластин за такою методикою: у ступці ретельно перемішують 3,2 г силікагелю і 7,5 мл води до отримання однорідної маси, яку наносять рівним шаром на пластинку. Пластинку висушують на горизонтальній поверхні протягом 3-х годин при температурі  $20 \pm 2$  °С, а потім активують у сушильній шафі при температурі  $110 \pm 5$  °С протягом 40–50 хвилин.

2) Камеру для проведення хроматографії готують за 40–50 хвилин до нанесення ліпідних зразків.

3) Перевірка придатності хроматографічної системи – система вважається придатною при виконанні таких умов

- ✓ Rf стандартного зразка лецитину («Sigma», каталожний номер Р 4279), повинен бути близько ( $0,27 \pm 0,03$ );
- ✓ при нанесенні розчину лецитину в кількості 50 мкг на хроматограмі має бути чітко видно пляму.



**Завдання 3.**

**ВИВЧЕННЯ СТУПЕНЯ ОКИСЛЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ  
(ІНДЕКС ОКИСЛЕНОСТІ)**

Для вивчення вільно-радикального окислення фосфоліпідів найчастіше використовують визначення перекисного індексу Клейна як співвідношення оптичної густини в УФ-спектрі (233 нм / 215 нм), який характеризує ступінь окислення ліпідів. Вміст первинних продуктів перекисного окислення ліпідів – дієнових кон'югатів визначають шляхом вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 233 нм. При довжині хвилі 215 нм поглинання ліпідів приблизно однаково. У зв'язку з цим збільшення перекисного окислення фосфоліпідів відбивається в збільшенні індексу Клейна.



### Хід роботи

Препарат у кількості 0,25 мл поміщають у мірну колбу об'ємом 25 мл і доводять об'єм до мітки спиртом етиловим; перемішують і вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвиль 215 нм і 233 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Як розчин порівняння використовують етиловий спирт. Індекс окисленості ( $X$ ) розраховують за формулою:

$$X = \frac{D_{233 \text{ нм}}}{D_{215 \text{ нм}}}, \quad X \leq 0,3.$$



#### Завдання 4.

### **ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЛІПІДІВ В РОЗЧИНІ**

### Хід роботи

Препарат (0,5 мл) поміщають в скляний бюкс, попередньо висушений до постійної маси в сушильній шафі при температурі 100–105 °С, і висушують при температурі  $75 \pm 5$  °С до постійної маси. Зважування проводять з точністю до четвертого десяткового знака.

Вміст ліпідів в препараті ( $X$ ) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(a-b) \cdot 100}{0,5},$$

де 0,5 – об'єм досліджуваного препарату, мл;

$a$  – маса бюкса з препаратом, висушеним до постійної маси, г;

$b$  – маса порожнього бюкса, висушеного до постійної маси, м

Вміст ліпідів обчислюють з двох паралельних дослідів.



#### Завдання 5.

### **ВИЗНАЧЕННЯ МАСОВОЇ ЧАСТКИ ФОСФАТИДИЛХОЛІНУ**

Масова частка повинна бути не менше 80 %. Визначення проводять методом хроматографії в тонкому шарі силікагелю.

## Хід роботи

Забарвлені у жовтий колір плями ліпідів, отримані на хроматограмі при визначенні автентичності препарату, обводять голкою. Пластинку нагрівають у сушильній шафі при температурі  $60 \pm 2$  °С протягом 40–50 хв до зникнення забарвлення плям. Зазначена пляма лецитину і інші плями ліпідів (сумарно) переносять в окремі колби Кьельдаля, додають 1 мл перхлорної кислоти і мінералізують на електроплитці протягом 5–6 годин до повного знебарвлення розчинів. Після охолодження до розчинів додають по 5 мл води, 1 мл 2,5 %-вого розчину амонію молібдату і 1 мл свіжоприготовленого 10 %-вого розчину кислоти аскорбінової. Стінки колб додатково промивають 2 мл води і нагрівають колби на киплячій водяній бані 5–6 хвилин. Після охолодження вміст колб переносять у центрифужні пробірки об'ємом 15–20 мл і центрифугують при швидкості обертання 3000–4000 об./хв протягом 10–12 хв. Вимірюють оптичну густину отриманої надосадної рідини на спектрофотометрі при довжині хвилі 820 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Паралельно таким же способом обробляють рівну ділянку чистого силікагелю і використовують отриманий розчин як розчин порівняння. Зміст лецитину в препараті ( $X$ ) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D \cdot 100}{D + D_1},$$

де  $D$  – оптична густина розчину лецитину;

$D_1$  – оптична густина розчину сумарних ліпідів.



### Контрольні запитання

1. Яка роль фосфоліпідів в біологічних мембранах?
2. Вкажіть властивості ліпідів в лікарських препаратах і обґрунтуйте переваги ліпосомальних препаратів.
3. Що таке екстракція?
4. Чому при виділенні фосфоліпідів використовують різні органічні розчинники? Обґрунтуйте це.
5. Опишіть основні методичні підходи до проведення хроматографії в тонкому шарі силікагелю.

6. З якою метою використовуються стандартні зразки фосфоліпідів при проведенні хроматографії?
7. З якою метою визначають індекс окислення фосфоліпідів? За якою формулою розраховують величину індексу окислення?
8. Яким методом визначають кількісний вміст домішок в препаратах фосфоліпідів?

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных исследований: практикум. / Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2017. – 208 с.
2. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 227 с.
3. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
4. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
5. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. / Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
6. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
7. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
8. Kozyrovska N. O. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology / N. O. Kozyrovska, O. M. Reva, V. B. Goginyan, J.-P. de Vera // *Biopolymers and Cell*. – 2012. – Т. 28, № 2. – С. 103–113.
9. Кароматов И. Д. Лечебные свойства чайного гриба (обзор литературы) / И. Д. Кароматов, С. И. К. Каххорова // *Биология и интегративная медицина*. – 2018. – Т. 18. – С. 381–394.
10. Vejarano R. *Saccharomyces ludwigii*, Control and Potential Uses in Winemaking Processes / R. Vejarano // *Fermentation*. – 2018. – V. 4, No. 71. – P. 1–19.

11. Lee K.-Y. On the use of nanocellulose as reinforcement in polymer matrix composites / K.-Y. Lee, Y. Aitomäki, L.A. Berglund et al. // *Composites Science and Technology*. – 2014. – V. 105. – P. 15–27.
12. Lee N. K. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. / N. K. Lee, W. S. Kim, H. D. Paik // *Food science and biotechnology*. – 2019. V. 28, No. 5. –P. 1297–1305.
13. Efremenkova O. Antimicrobial Properties of the Probiotic Strain Bacillus Subtilis 534. / O. Efremenkova, N. Gabrielyan, I. Malanicheva et al. // *International Archives of Medical Microbiology*. – 2019. – V. 2, No. 1. – P. 1–10.
14. Earl A. M. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. / A. M. Earl, R. Losick, R. Kolter // *Trends in microbiology*. – 2008. – V. 16, No. 6. – P. 269–275.
15. Шахмаєв А. Є. Технологічні принципи одержання ліпосомальних лікарських препаратів. / А. Є. Шахмаєв, Ю. М. Краснопольський, І. В. Волчик, В. І. Швець // *Український біофармацевтичний журнал*. – 2012. – Т.21, №4. – С.4–14.
16. Пилипенко Д. М. Нанобиотехнологические формы гидрофобных антиоксидантов: научные основы получения, фармакологические и терапевтические свойства: в монографии «Актуальные проблемы биотехнологии и биоинженерии» / Пилипенко Д. М., Звягинцева О. В., Краснопольский Ю. М. – Харьков: Типография Мадрид, 2019. – С. 9–72.
17. Krasnopolsky Yu. M. “Quality By Design” in liposomal drugs creation / Yu. M. Krasnopolsky, D. M. Pylypenko // *Biotechnologia ACTA*. – 2020. – V. 13, No. 6. – P. 5–12.

## ЗМІСТ

Вступ.....	3
Лабораторна робота 1. Дослідження продуктів метаболізму у культуральній рідині «чайного гриба».....	4
Контрольні запитання.....	13
Лабораторна робота 2. Одержання, виділення та контроль ферментативної активності бактеріальної амілази.....	15
Контрольні запитання.....	28
Лабораторна робота 3. Одержання та контроль фосфоліпідного комплексу, збагаченого фосфатидилхоліном (лецитином) для застосування складі фармацевтичних препаратів... ..	30
Контрольні запитання.....	42
Список літератури.....	44

Навчальне видання

## **МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

до виконання лабораторних робіт  
з курсу «Фармацевтична біотехнологія»  
для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Укладачі: КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович  
ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна

Відповідальний за випуск проф. Близнюк О. М.  
Роботу до видання рекомендував проф. Циганков О. В.  
В авторській редакції

План 2021 р., поз. 240.

Підп. до друку 28.10.21. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.

Друк – ризографія. Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 2,8.

Наклад 50 прим. Зам. № 3016. Ціна договірна.

---

Видавничий центр НТУ «ХП».

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.  
61002, Харків, вул. Кирпичова, 2

---

Віддруковано ТОВ «Друкарня Мадрид»  
61024, м. Харків, вул. Максиміліанівська, 11. Тел.: 0800 33 67 62  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи Серія ДК № 4399 від 27.08.2012 р.  
[www.madrid.in.ua](http://www.madrid.in.ua)      [info@madrid.in.ua](mailto:info@madrid.in.ua)