

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » ЛЮТОГО 2022 г.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » ЛЮТОГО 2022 г.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біосинтез протипухлинних сполук актинобактеріями

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

_____ ТЕРЕЩУК Діана Олександрівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СТАБНІКОВА Олена Всеволодівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) _____ (підпис)

Консультанти _____ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

_____ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Рецензент Ігор КРОНІКРОВСЬКИЙ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незарплатованої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТЕРЕЩУК Діани Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез протипухлинних сполук актинобактеріями

керівник роботи СТАБНИКОВА Олена Всеволодівна, проф., д.т.н.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 865-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces sp.* MWW064, цільовий продукт: ракіцидін, лікарська форма: тверді желатинові капсули

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Розділ 1. Виробництво біоактивних сполук актиноміцетами та їх протипухлинні властивості. Розділ 2. Похідні штами *streptomyces sp.* з протипухлинною активністю. Розділ 3. *Streptomyces sp.* Mww064 та інші актинобактерії продуценти ракіцидін. Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування. Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу ракіцидину. Розділ 6. Специфікація обладнання. Розділ 7. Опис технологічної схеми. Розділ 8. Контроль виробництва ракіцидину. Розділ 9. Обґрунтування вибору стадій виділення та очищення цільового продукту. Розділ 10. Специфікація обладнання. Розділ 11. Викладення технологічного процесу. Розділ 12. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лз. Розділ 13. Специфікація обладнання. Розділ 14. Опис технологічної схеми. Розділ 15. Контроль виробництва ракіцидину в капсулах

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва-3 аркуші формату А1. Апаратурна схема виробництва – 3 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Виробництво біоактивних сполук актиноміцетами та їх протипухлинні властивості.	03.11.2021 - 10.11.2021	
2	Похідні штами streptomyces sp. з протипухлинною активністю	11.11.2021 - 18.11.2021	
3	<i>Streptomyces sp. Mww064</i> та інші актинобактерії продуценти ракіцидін.	19.11.2021 - 25.11.2021	
4	Техніко-економічне обґрунтування.	26.11.2021 - 5.12.2021	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу ракіцидину.	6.12.2021 - 27.12.2021	
6	Специфікація обладнання.	28.12.2021 - 10.01.2022	
7	Опис технологічної схеми.	11.01.2022 - 16.01.2022	
8	Контроль виробництва ракіцидину.	26.11.2021 - 5.12.2021	
9	Обґрунтування вибору стадій виділення та очищення цільового продукту.	28.11.2021 - 5.12.2021	
10	Специфікація обладнання.	30.11.2021 - 5.12.2021	
11	Викладення технологічного процесу	01.12.2021 - 5.12.2021	
12	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лз	03.01.2021 - 5.12.2021	
13	Специфікація обладнання.	04.01.2021 - 5.12.2021	
14	Опис технологічної схеми.	05.01.2021 - 5.12.2021	
15	Контроль виробництва ракіцидину в капсулах	12.01.2021 - 5.12.2021	
16	Оформлення пояснювальної записки	17.01.2022 - 23.01.2022	
17	Виконання графічної частини роботи	24.01.2022 - 01.02.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Діана ТЕРЕЩУК
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____

Олена СТАБНІКОВА

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічного процесу виробництва ракіцидіну (продуцент *Streptomyces sp.* MWW064) у вигляді твердих желатинових капсулах.

Технологія виробництва препарату включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва), основний технологічний процес представлений такими послідовностями: біосинтез цільового продукту, який здійснюється у ферментері об'ємом 0,4 м³, та підготовчі етапи для біосинтезу (у ферментерах об'ємами 40 л та в колбах на качалці. Поживне середовище готується в окремих композиціях у реакторах. Друга частина представлена виділення ракіцидіну з культуральної рідини після виробничого біосинтезу, зокрема (лізис, центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація, хроматографія, кристалізація, сушіння у розпилювальній сушарці) стадії пакування, маркування, відвантаження та знешкодження відходів, що наведені на технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота викладена на 190 сторінках друкованого тексту, містить 325 таблиці 2 схеми, 23 рисунків і складається з п'ятнадцяти розділів, списку використаної літератури (50 джерел) та графічної частини (креслення формату A1).

Ключові слова: *Streptomyces sp.* MWW064, виробничий біосинтез, ракіцидін, виділення, центрифугування, кристалізація.

Зміст

Вступ	7
РОЗДІЛ 1. Виробництво біоактивних сполук актиноміцетами та їх протипухлинні властивості.....	8
1.1 Актиноміцети як потенційні джереланових протипухлинних препаратів	19
РОЗДІЛ 2. Похідні штами <i>Streptomyces</i> sp.....	25
з протипухлинною активністю	25
РОЗДІЛ 3. <i>Streptomyces</i> sp. MWW064 та інші актинобактерії продуценти ракіцидину	37
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	44
4.1 Потреба у цільовому продукті	44
4.2 Розрахунок потужності виробництва.....	45
4.3 Розрахунок потужності виробництва.....	46
4.4 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	47
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ РАКІЦИДИНУ	49
5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування.....	49
2.2. Обґрунтування вибору способу культивування та типу ферментера	55
2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища	56
2.3.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці.....	56
2.3.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	57
2.3.4 Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу	58
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	59
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	63
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РАКІЦИДИНУ	72
РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	80

РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	92
РОЗДІЛ 11. ВИКЛАДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	95
РОЗДІЛ 12. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ.....	111
РОЗДІЛ 13. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	147
РОЗДІЛ 14. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	153
РОЗДІЛ 15. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РАКІЦИДІНУ В КАПСУЛАХ	167
15.1 Контроль мікробіологічної чистоти рук та одягу персоналу, який працює у виробничих приміщеннях	167

Вступ

Зростання онкологічної захворюваності в останні десятиліття у світі в цілому і в Україні, зокрема, висуває проблему ранньої діагностики та раціонального лікування хворих онкологічного профілю, створення надійної системи обліку та спостереження за цим контингентом у один ряд із найважливішими проблемами сучасної медичної науки [3]. Незважаючи на значні досягнення у створенні досконалої діагностичної апаратури, розробці нових технологій та засобів діагностики та лікування тощо, у більшості хворих пухлини діагностують у запущених стадіях, коли неможливе найбільш ефективне радикальне хірургічне лікування, а може бути здійснене тільки паліативне і симптоматичне, що дає незадовільні результати.

Ракіцидин є відомим представником невеликого класу макроциклічних природних продуктів ліподепсипептиду, які містять електрофільну функціональність 4-амідо-2,4-пентадієноату (APD). Ракіцидин виявляє селективну інгібуючу активність щодо гіпоксичних ракових клітин, а також стійких до іматинібу клітин хронічного мієлолейкозу (ХМЛ). Гіпоксія є загальною рисою багатьох пухлин і сприяє їх прогресуванню. Гіпоксичні клітини пухлини не тільки беруть участь у терапевтичній стійкості до хіміо- та променевої терапії, але також мають значення для ангіогенезу пухлини. Ракіцидин був приблизно в 17,5 разів більш цитотоксичним за гіпоксичних, ніж за нормоксичних умов. [4]

Новизна роботи: штам *Streptomyces sp.* MWW064, макроциклічний природний продукт ліподепсипептиду, який містить електрофільну функціональність 4-амідо-2,4-пентадієноату (APD), здатен синтезувати ракіцидину у достатньо високій концентрації (9,3 г/л), порівняно з іншими продуцентами.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Терешук Л.О.			Вступ			Лім.	Арк.	Акрушів
Консульт.									1	177
Керівник		Станікова О.В.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Зав. каф.		Стабніков В.П								

Розділ 1. Виробництво біоактивних сполук актиноміцетами та їх протипухлинні властивості

Завдяки своїй корисній біологічній діяльності вторинним метаболітам приділяється значна увага, особливо щодо значного впливу на організм людини. Біосинтез цих вторинних метаболітів за допомогою інженерії та промислової біотехнології пропонує значну перевагу перед звичайними методами отримання з біомаси. Серед мікроорганізмів морські бактерії продукують унікальні та нові вторинні метаболіти, і ці організми проявляють значну біологічну активність. Поряд з різними типами бактерій, актиноміцети також відіграють значну роль у фармацевтичній та медичній промисловості завдяки своїй здатності виробляти вторинні метаболіти з різною хімічною структурою та біологічною активністю. Виділено та охарактеризовано тисячі біоактивних сполук.

Отже, актиноміцети вважаються найпотужнішим джерелом для виробництва вторинних метаболітів, антибіотиків та інших біоактивних сполук. Добре встановлено, що кожен штам актиноміцетів, ймовірно, має генетичну потенційну здатність продукувати 10–20 вторинних метаболітів. Велика кількість доказів свідчить, що актиноміцети заслуговують на увагу як виробники антибіотиків, що становлять 75% усіх відомих продуктів та протипухлинні сполуки. Стрептоміцес дав багато терапевтичних засобів, які включають антибактеріальні засоби, такі як тетрацикліни, протигрибкові засоби, такі як амфотерицин, та протипухлинні препарати, наприкладі адриаміцину та імунодепресантів такролімусу. Стрептоміцети та споріднені актиноміцети продовжують залишатися корисними джерелами нових вторинних метаболітів із цілим рядом біологічних препаратів, які в кінцевому підсумку можуть знайти застосування як протипухлинні засоби, протипухлинні засоби або інші фармацевтично корисні сполуки.

НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Терещук Л.О.				Розділ 1. Виробництво біоактивних сполук актиноміцетами та їх протипухлинні властивості.	Літ.	Арк.
Консульт.						8	177
Керівник	Станікова О.В.					Кафедра БТМ	
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

Тому скринінг, виділення та характеристика перспективних штамів актиноміцетів, що продукують потенційні антибіотики та інші терапевтичні засоби, були основною частиною досліджень. Дослідження зосереджуються на реакції антиоксидантної системи бактерій, що є важливим з точки зору біотехнології, наприклад, зростання *Streptomyces* при різних окисних стресових умовах. *Nocardiopsis* є одним з актиноміцетів, який може виробляти різні типи фармакологічних сполук з антиоксидантними, протипухлинними, протизапальними, антибактеріальними та антиоксидантними властивостями. Пошук унікального актиноміцету, який метаболізує важливий компонент у натуральних препаратах на основі продуктів, стає все більш цікавим та значущим. Антиоксиданти відіграють важливу роль у пригніченні та знешкодженні вільних радикалів, забезпечуючи тим самим захист людини від різних інфекцій та дегенеративних захворювань [14]. Або збільшення вільних радикалів, або зменшення антиоксиданту може призвести до окисного стресу, що означає ідентифікацію природних антиоксидантів. Сучасні дослідження зараз спрямовані на природні антиоксиданти з рослин та мікроорганізмів, які служать безпечними терапевтичними засобами]. Тому основною метою цієї роботи є опис нових біоактивних сполук з актиноміцетів та виявлення їх антиоксидантних та протипухлинних властивостей.

У дослідженні Д. В. Сайгопал виділяв актиноміцет із ґрунту мангрових земель, зібраної в районі Неллор штату Андхра-Прадеш, штат Індія, та перевірений на здатність продукувати біоактивні сполуки. Культурні, морфологічні та біохімічні ознаки та секвенування 16S рРНК дозволяють припустити, що ізольованим штамом є *Nocardiopsis alba*. Біоактивні сполуки, отримані цим штамом, очищали за допомогою колонкової хроматографії. У пробірці оцінювали антиоксидантну здатність виділених сполук (фракцій), і фракція F2 показувала дуже близькі значення до стандартної аскорбінової кислоти. Потенційну фракцію, отриману за допомогою колонкової хроматографії, піддавали ВЕРХ для подальшого очищення, потім цю очищену фракцію F2 досліджували за допомогою FTIR, ЯМР та мас-спектроскопії для з'ясування її хімічної структури. За спектральними даними, структуру виділеної сполуки та визначено як ракіцидін. Ізольовані штами пройшли

скринінг для отримання біоактивних сполук. Після інкубації відвар фільтрували і фільтрат використовували для перевірки антимікробної активності. Ракіцидин виявив сильні антиоксидантні та цитотоксичні властивості та при незначних концентраціях чинить інгібуючу дію на клітини раку легенів.[1]

Кумар Саурав у своєму дослідженні оцінив цитотоксичність та антиоксидантну активність ракіцидину, витягнутої з *Streptomyces* VITSVK5 spp. Штам був виділений із зразків осаду, відібраних на узбережжі Маракканам у Бенгальській затоці, Індія. Систематичний скринінг ізолятів на активність до *Aspergillus* привів до ідентифікації видів *Streptomyces*, позначених як *Streptomyces* VITSVK5 spp. Екстракція та очищення за допомогою біоактивності давали сполуку ракіцидин та тестували на цитотоксичність та антиоксидантну активність. Структура екстрагованої сполуки була встановлена спектроскопічними дослідженнями і ідентифікована як ракіцидин.

Ракіцидин виявляв цитотоксичну активність на клітинних лініях HEP 2 та Hep G2 з IC_{50} значення 2,8 мкг/мл та 8,3 мкг/мл відповідно, порівняно з клітинною лінією Vero (22,6). Ракіцидин показав гемолітичну EC_{50} значення 288 мкг/мл на еритроцити людини. Лікування показало менше (31,7%) росту ракових клітин. Результати цього дослідження показали, що ракіцидин є цитотоксичним для ракових клітин і має антиоксидантну властивість.[2]

А. Бесерріль-Еспіноса вивчав біоактивність культивованих актинобактерій з морського осаду затоки Тодос Сантос, Мексика, і бактерії були ідентифіковані за допомогою послідовностей генів 16S рРНК. Органічні компоненти культур екстрагували амбралітом XAD-7 і елюювали ацетоном. Екстракти відокремлювали флеш-хроматографією на силікагелі С-18. Сирі екстракти та фракції тестували на колоректальні ракові клітини HCT-116. Загалом було культивовано та ідентифіковано двадцять шість штамів, розділених на десять оперативних таксономічних одиниць (OTU) зі 100% ідентичністю послідовності, що представляють 3 родини з порядку Actinomycetales, що належать до роду *Streptomyces* (77%), *Micromonospora* (20%) та *нокардія* (3%); про шість із цих ОТУ раніше не повідомлялося. Дев'ятнадцять відсотків сирих екстрактів роду *Streptomyces* виявляли цитотоксичну активність у діапазоні IC_{50} від

69,0 до $\leq 0,076 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Було досліджено нову сполуку – ракіцидин. Найактивніші фракції містили сполуки, визначені за їх молекулярною масою та структурою фрагментації як похідні монактину та памамицину. Кожен органічний екстракт тестували на колоректальні ракові клітини НСТ-116. Середню інгібуючу концентрацію IC_{50} ($\text{мкм} \cdot \text{мл}^{-1}$) розраховували за початковим аналізом активності з використанням методу розведення в 96-лунковому планшеті. Для визначення IC_{50} першим кроком було забезпечення % виживання клітин для кожного аналізу і мішені, після чого смертність коригували за формулою Еббота.[3]

Сахар А. Ель-Шатурі разом зі співавторами виділив шістдесят три штами актиноміцетів з морських молюсків *Donax trunculus anatinus*, були фенотипово ідентифіковані як десять родів, крім двох невстановлених штамів. Їх метаболічні екстракти виявляли широку антимікробну активність щодо 11 референтних та клінічних культур та 17,5% показали протипухлинну активність із солідною пухлинною селективністю чотирьох штамів *Nocardioides*, *Kitasatosporia* та *Streptomyces*. Було виявлено нову сполуку та ідентифіковано як ракіцидин. Особливо відзначався своєю високою протипухлинною активністю щодо асцитової карциноми Ерліха з інгібуючим ефектом плато при концентраціях 500, 250 і 50 мкг/мл, обіцяючи тверду селективність пухлини та високу цитотоксичність для раку людини печінки (HEPG2), шийки матки (HELA) та грудей (MCF7) (IC_{50} : 3,89, 9,4 та 10 мкг / мл відповідно). [4]

Куй Хонг разом з дослідниками виділили ізоляти та дослідили для визначення їх активності за п'ятьма скринінговими моделями з високою цитотоксичною здатністю, а саме щодо клітин пухлини товстої кишки (НСТ) 116, *Candida albicans* ATCC 10231, золотистого стафілокока ATCC 51650. Штами показали активність проти клітинної лінії пухлини (16,8%), 198 проти *S. aureus* (9,7%), 101 проти *C. albicans* (4,9%) та 59 проти РТР1В (2,9%); лише ізоляти пригнічували каспазу. Крім того, 9 із 343 цитотоксичних штамів виявляли активність проти полярного саява А - білка, що відноситься до показника протиракової активності. Деякі ізоляти демонстрували активність більш ніж на одному з екранів. Нова сполука була виділена та ідентифікована як ракіцидин. Найвищий відсоток

протипухлинної активності виявлено у штамів, виділених із зразків, відібраних із Чжаньцзяна. Ізоляти з зразків показали активність щодо всіх скринінгових моделей, включаючи два з трьох ізолятів, які інгібують каспазу, можливо, відображаючи різноманітний характер видів рослин, що ростуть у цих добре збережених місцях. На відміну від цього, найменша кількість біоактивних штамів була зафіксована за зразками Гуансі; було зазначено, що ґрунт з цього місця містив більше піску та менше органічних речовин, ніж ґрунт з інших місць.

В ході аналізу її отриманих зразків було виділено та ідентифіковано нову сполуку – ракіцидін. Вчені здійснили дослідження на клітині лінії раку печінки та визначили високу цитотоксичну активність при малих концентрацій – 04 мг/л. [5]

У цьому дослідженні Сутхінгіран із співавторами виступили з ініціативою щодо виділення культивованих галофільних актиноміцетів та скринінгу біоактивного потенціалу. Зразок морських відкладів був зібраний на глибині 400 см у Маракканамі. Штам був виділений із застосуванням середовища ISP №2 з додаванням 25% морської води. Поліфазну систематику штаму оцінювали фенотиповим, хемотаксономічним та філогенетичним аналізом. Проведено секвенування 16S рРНК та вивчено філогенетичні взаємозв'язки з найближчими спорідненими видами. Умови росту та середовище були оптимізовані в умовах струшування колби шляхом вимірювання сухої маси міцелію. Ізолят піддавали ферментації, а неочищений екстракт перевіряли на цитотоксичну, гемолітичну та антимікробну активність. Цитотоксичність оцінювали на клітинах HeLa методом МТТ, гемолітичний аналіз на мишачих еритроцитах, а антимікробну активність визначали методом дифузійної агаризації. Результати: на основі багатофазної систематики вид було визначено як *Saccharopolyspora salina* та належить до роду *Saccharopolyspora*. Послідовність 16S рРНК ізоляту продемонструвала 100% схожість із *Saccharopolyspora salina*. На основі філогенетичної та фенотипової оцінки ізолят був позначений як *Saccharopolyspora salina* VITSDK4. Цитотоксичність на клітинах HeLa показала значення IC_{50} 26,2 мкг мл⁻¹ за методом МТТ. Гемолітична активність на мишачих еритроцитах показала значення EC_{50} 266 мкг мл⁻¹. Сирий екстракт також виявляв значну антагоністичну активність щодо збудників грибів *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* та

грамнегативних бактерій *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*. Лише помірна активність спостерігалася щодо грампозитивних бактерій *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis*. [6]

Стюарт Робінсон разом з вченими досліджували кігаміцин С. Основний аналог сімейства метаболітів був виділений препаративною ВЕРХ і ідентифікований як кігаміцин С. Кігаміцини - це сімейство метаболітів, які нещодавно були виділені та ідентифіковані з ізоляту *Amycolatopsis*. Екстракти всіх штамів виявляли потужну антибактеріальну та протипухлинну активність завдяки наявності кігаміцинів. Протипухлинну активність визначали в аналізі проліферації мікропланшетних клітин. Антибактеріальну активність визначали в аналізі мікропланшетів на основі агару. З цього багатофазного дослідження видно, що сім ізолятів утворюють однорідний таксон, який можна відрізнити від представників усіх відомих видів *Amycolatopsis*. Вчені пропонують визнати цей таксон новим видом *Amycolatopsis*, а саме *Amycolatopsis regifaucium* sp. [7]

Х. Левборг разом із вченими розробив багатопараметричний скринінговий тест для вимірювання апоптозу. Отримані зразки ідентифікували та визначили їх активність. Випробовували на клітинні лінії раку легень. Клітини HeLa та лімфоми U-937 піддавали дії цитотоксичних препаратів на оптичних мікропланшетних планшетах з плоским дном. Після інкубації додали ДНК-зв'язуючий барвник Hoechst 33342, флуоресцеїнові зонди, ковалентно зв'язують активні каспази та хлорметил-X-розамін для виявлення мітохондріального мембранного потенціалу (ММР). Корисність аналізу була перевірена в клітинах, що зазнали дії стандартних цитотоксичних препаратів, а також в експериментальному цитотоксичному ціаногуанідині CHS 828. Часова і дозова активація каспази-3, зменшення ММР, та збільшення ядерної фрагментації та конденсації спостерігали для стандартних препаратів, з можливістю корелювати параметри на основі однієї клітини. CHS 828 індукував активацію каспази-3 та зниження ММР зі незначними змінами в морфології ядер. [8]

Е. Ерба у своїх дослідженнях встановив, що тіокоралін, новий протипухлинний засіб, отриманий з морського актиноміцету *Micromonospora marina*, викликає глибокі збурення клітинного циклу. Як на LoVo, так і на SW620

клітинних ліній раку товстої кишки людини, тіокоралін викликав зупинку в фазі G1 клітинного циклу та зменшення швидкості прогресування фази S до фаз G2/M, як оцінювали за допомогою біпараметричного цитометричного аналізу бромодезоксиуридину/ДНК. Тіокоралін не інгібує ферменти ДНК-топоізомерази II *in vitro*, а також не викликає розщеплення ДНК у клітинах, що зазнають ефективних концентрацій лікарських засобів. Ефекти клітинного циклу, що спостерігаються після впливу тіокораліну, судячи з інгібування реплікації ДНК. За допомогою аналізу розширення праймерів було встановлено, що тіокоралін інгібує подовження ДНК за допомогою ДНК-полімерази альфа у концентраціях, які пригнічують прогресування клітинного циклу та клоногенність. Ці дослідження вказують на те, що новий протипухлинний препарат тіокоралін, ймовірно, діє, пригнічуючи активність альфа ДНК-полімерази.[9]

Бюнґ Кук Хван у своєму дослідженні з культури *Streptomyces violaceoniger* A50 були виділені три антибіотичні протипухлинні сполуки, сильно інгібуючі *Phytophthora capsici* або *Magnaporthe grisea*. Суміш антибіотиків із відвару частково очищалися за допомогою колонкової хроматографії XAD-2. Протипухлинні сполуки розділяли колонковою хроматографією на силікагелі, а потім очищали на колонці Sephadex LH-20, отримуючи три піки активності: SF1A, SF1B і SF2A. Чистий SF2A додатково очищали за допомогою препаративної ВЕРХ та ідентифікували як пірроло [2,3-*d*]-піримідиновий нуклеозид туберцидин на основі спектральних даних УФ, ¹H та ¹³C ЯМР та інших хімічних доказів. SF2A і автентичний туберцидин показали високу протипухлинну активність.

М. О. Фредімос виділив п'ять актиноміцетів АСТ01 та АСТ02, що показали IC₅₀ значення з концентраціями (10,13 ± 0,92) та (22,34 ± 5,82) мкг/мл відповідно для клітинної лінії MCF-7 через 48 годин, але АСТ01 показав мінімальний (18,54 ± 2,49 мкг/мл) рівень IC₅₀ значення з клітинною лінією MDA-MB-231. Аналіз філогенетичного дерева показав, що ізоляти АСТ02 та АСТ03 були представлені у групах I та III відповідно, але АСТ01 та АСТ02 були представлені у групі II. Прогнозування вторинної структури 16РРНК показало, що максимум вільної енергії споживався з ізолятом АСТ03 (-45. Ізоляти актиноміцетів АСТ01 та АСТ02 (GQ478246 та GQ478247), які виділяють із зразка осаду, можуть надалі

використовуватися як протипухлинні засоби проти клітинних ліній раку молочної залози.

Кок-Ган Ча дослідили *Streptomyces* sp. MUM265 - штам, який був виділений та ідентифікований з мангрового лісу Куала-Селангор. Це дослідження також показало, що екстракт MUM265 продемонстрував цитотоксичність щодо клітин раку товстої кишки, про що свідчить знижена життєздатність клітинної лінії Сако-2. Лікування штамом MUM265 викликало деполяризацію потенціалу мембрани мітохондрій та накопичення клітин subG₁ в аналізі клітинного циклу, припускаючи, що MUM265 чинив індукуючий апоптозний вплив на клітини. Також здійснювали дослідження мунубіцинів. Мунумбіцини А, В, С та D - це нещодавно описані антибіотики, що мають широкий спектр дії проти багатьох ліній раку. Ці сполуки були отримані з *Streptomyces* NRRL 3052, який є ендоефітом у лікарській рослині зміїної корови (*Kennedia nigriscans*), корінною на північній території Австралії. Цей ендоефіт культивували, бульйон екстрагували органічним розчинником і вміст залишку очищали методом ВЕРХ з біологічним аналізом. Основними компонентами були чотири функціоналізовані пептиди з масою 1269 · 6, 1298 · 5, 1312 · 5 і 1326 · 5 Да. Численні інші споріднені сполуки, що володіють біоактивністю, з різними масами, також були присутні в екстракті відвару культури в менших кількостях. За невеликим винятком, пептидна частина кожного компонента містила лише загальні амінокислоти треонін, аспарагінову кислоту (або аспарагін), глутамінову кислоту (або глутамін), валін та пролін у різних співвідношеннях. Мунбуміцини мали дуже різну біологічну активність залежно від цільового організму. Наприклад, mupumbicin Б мали має вплив на штам золотистого стафілокока, в той час як mupumbicin А не активний в відношенні цього організму. Загалом, мунумбіцини демонстрували активність проти грампозитивних бактерій, таких як *Bacillus anthracis* та мультирезистентних мікобактерій туберкульозу. Тим не менше, найбільш вражаюча біологічна активність будь-якого з mupumbicins була то, що mupumbicin D діє проти малярійного паразита *Plasmodium фальціпарума*, що має IC₅₀ 4 · 5 ± 0 · 07 нг мл⁻¹. Інгібуючі концентрації (IC₅₀) для мікобактерій туберкульозу. Значення IC₅₀ були визначені до лікарських засобів туберкульозу (MDR-P) та стандартного штаму

(H37Rv, ATCC 25618) цього організму. Модифікована процедура, яка зазвичай використовується для тестування повільно зростаючих бактерій, була використана для визначення ефективності мунумбіцинів проти цих бактерій. Випробовувані сполуки розчиняли в ДМСО і відповідним чином розбавляли та поміщали в агар *Mycobacteria* 7H11, доповнений збагаченням 10% OADC (олеїнова кислота-альбумін-декстроза [глюкоза] -каталаза). IC₅₀ значення розраховували за допомогою лінійного регресійного аналізу ділянок відновлюваного *M. tuberculosis* щодо концентрації введеного препарату. Цей експеримент вимагав відносно великої кількості мунумбіцинів і був повторений двічі. [10]

Професор Діпеш-Дакал вивчав ендеїни (протипухлинні сполуки, які виробляються ґрунтовими та водними мікроорганізмами). Його структура характеризується базовою структурою, в якій два ацетиленові зв'язки сполучені, утворюючи подвійний зв'язок у 9- або 10-членному кільці. Завдяки дії основної структури, ендеїни мають протипухлинну та антибіотичну активність. Проф. Шен та його команда провели скринінгові програми, засновані на геномному аналізі приблизно 3200 штамів актиноміцетів, та ідентифікували 89 штамів, які несуть касету PKEN enediin у своєму геномі. У цьому проекті два з ідентифікованих штамів (CB02115 та CB100675) були проаналізовані під час пошуку нових структурних елементів ендеїна в периферійних регіонах кластерів генів за допомогою видобутку геному. CB02115 має кластер генів, подібний до відомого кластеру генів C-1027 від *Streptomyces globisporus*, а кластер CB 100675 подібний до кластеру каліхеаміцину з *Micromonospora echinospora*. Було визначено структуру ендеїнів нових штамів та визначено гени, відповідальні за біосинтетичні стадії їх незвичних побічних груп. Для функціонального та структурного аналізу різних нових біосинтетичних ферментів, для яких також може знадобитися використання хімічно синтезованих модельних субстратів, їх гени та їх похідні повинні бути виражені в *E. coli* та виділених білкових продуктах. [11]

Морські актиноміцети мають великий потенціал для утворення унікальних біоактивних речовин сполуки завдяки їх особливій адаптації в суворому океанічному середовищі. Поточне дослідження А. Бахрі спрямоване на виділення протиракових сполук, що продукують актиноміцети, з осадів лісів та дослідити їх

потенціал проти раку молочної залози. Сорок штамів культивували в крохмальному казеїновому відварі, а метаболіти-екстрагували з використанням етилацетату. Отриманні метаболіти витягували з штамів та їх цитоцидну активність оцінювали щодо клітинної лінії раку молочної залози. Окрім того з осадів було виділено та ідентифіковано 186 штамів. Результати показали що ізоляти мали цитоцидну активність проти клітинної лінії раку молочної залози. Згідно результатів, було виявлено, що штами 2HP і 4HP виявляють більшу протиракову активність, ніж інші штами. [12]

Р. Асолкар у своїй роботі відкрив три нових циклогексадепептиди, аренаміди АС (1-3), були виділені з ферментаційного бульйону морського штаму бактерій, ідентифікованого як *Salinispora arenicola*. Площинні структури цих сполук були визначені шляхом детальної інтерпретації спектроскопічних даних ЯМР та МС/МС. Абсолютні конфігурації амінокислот та хіральних центрів на бічному ланцюзі були встановлені за допомогою методів Марфі та модифікованих методів Мошера. Вплив аренамідів А і В на активність NF κ B вивчали на стабільно трансфікованих клітинах нирок ембріональної клітини людини 293/NF κ B-Luc, індукованих лікуванням фактором некрозу пухлини (TNF). Аренаміди А (1) та В (2) блокували активацію, спричинену TNF, залежно від дози та часу зі значеннями IC₅₀ 3,7 та 1,7 мкМ відповідно. В додаток, сполуки пригнічували вироблення оксиду азоту (NO) та простагландину E (2) (PGE (2)) з індукованим ліпополісахаридом (LPS) макрофагами RAW 264,7. Помірна цитотоксичність спостерігалася при клітинній лінії раку товстої кишки HCT-116, але цитотоксичний ефект не спостерігався при культивованих клітинах RAW. У сукупності ці дані дозволяють припустити, що хіміопрофілактичні та протизапальні характеристики аренамідів А і В вимагають подальшого розслідування.[13]

Вчені С. Пінді, Чжен Хуан Ін, Ін Ван Хайбін та Ло Венъ-цзюнь у своїх дослідженнях виявили антибактеріальну та протипухлинну активність 165 ендofітних актиноміцетів, виділених із лікарських рослин *Xishuangbanna*, перевіряли методом перенесення агару та методом WST-8. Був відібраний штам D62, який має високу інгібуючу активність щодо грибів та пухлинних клітин, і додатково вивчені його вторинні метаболіти. Всього було виділено 6 сполук, а саме

Антиміцин А4а (1), Антиміцин А7а (2), Антиміцин А2а (3), Антиміцин А1а (4), 10-гідрокси-10-метил-додек-2-ен-1,4-олід (5) та 6- (2- (4-амінофеніл) -2-оксоетил) - 3,5-диметил-тетрагідропіран-2-он (6), з яких сполука 6 є новою сполукою. Наведені вище результати вказують на те, що ендофітні актиноміцети лікарських рослин мають хороший потенціал розвитку як новий тип мікробних ресурсів. [14]

У цьому дослідженні Ю. Пі разом із співробітниками дослідили протипухлинну активність актиноміцетів, виділених із зразка аридного ґрунту, зібраного в Кару, Південна Африка. Вісімдесят шість штамів актиноміцетів були виділені та очищені, з них тридцять чотири морфологічно різні штами були протестовані на антипухлинну активність. Серед 35 ізолятів 10 (28,57%) показали як антибактеріальну, так і протигрибкову активність. Етилацетатний екстракт штаму KRG-1 виявляв найсильнішу протипухлинну активність і тому був обраний для подальшого дослідження. [15]

Метою дослідження Кок-Ган Чана було виділити та ідентифікувати актинобактерії з мангрових лісів Малайзії та провести їх скринінг на отримання протипухлинних вторинних метаболітів. Вісімдесят сім ізолятів було виділено із зразків ґрунту, зібраних на 4 різних ділянках. Це перший звіт, що описує виділення *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Sinomonas*, *Nocardia*, *Terrabacter*, *Streptacidiphilus*, *Micromonospora*, *Gordonia* та *Nocardioides* із мангрових заростей на східному узбережжі Малайзії. З 87 ізолятів принаймні 5 ізолятів вважаються новими таксонами. Дев'ять *Streptomyces* sp. ізоляти продукували вторинні метаболіти.

Відкриття нового виду *Streptomyces pluripotens* sp. MUSC, який продукував вторинні метаболіти, що інгібують ріст MRSA, забезпечив перспективні метаболіти для дослідження лікарських засобів. Біосинтетичний потенціал 87 ізолятів досліджували шляхом виявлення генів полікетидсинтетази (ПКС) та нерибосомних полікетидсинтетаз (НРПС), що є ознаками утворення вторинних метаболітів. Результати показали, що багато ізолятів були позитивними щодо генів PKS-I (19,5%), PKS-II (42,5%) та NRPS (5,7%), вказуючи на те, що мангрові актинобактерії мають значний біосинтетичний потенціал. [16]

Г. Пей досліджував біоактивні речовини ракіцидин А (1), В (2) та Е, які були виділені з *Micromonospora sp.* культивується після введення камери дифузійного росту в губку *Rhabdastrella globostellata*. Три ракіцидини були протестовані в різних антибіотичних аналізах, що виявили їх селективну активність щодо грампозитивних бактерій, включаючи стійкі штами золотистого стафілокока. За допомогою аналізу MALDI-TOF MS та RiboPrinter можна уточнити взаємозв'язок між штамом продуцента та 13 штамми типу *Micromonospora* (99% ідентичності в послідовності 16S рРНК). На сьогоднішній день повідомляється, що ракіцидини А (1) і В (2) інгібують клітинні лінії пухлини, не виявляючи жодної антибіотичної активності. Проте під час постійного скринінгу на антибіотики штам Guam1582 виділявся діями проти метицилінорезистентного золотистого стафілокока (MRSA) та стійкого до ванкоміцину *Enterococcus faecium* (VREF).

Описано, що ці речовини виробляються різними *Micromonospora spp.*, а також штамми *Micromonospora chalybeata* (ракіцидин В). Через тісний зв'язок морського ізоляту Гуам1582 з *M. chalybeata* (DSM 43026^T) та інших штамів типу *Micromonospora* у послідовності 16S рРНК (99% ідентичності), диференціацію від інших штамів проводили за допомогою аналізу MALDI-TOF та RiboPrinter. [17]

1.1 Актиноміцети як потенційні джереланових протипухлинних препаратів

А. Лоріко у своїй роботі виділив ельзаміцин (ЕМ). Нещодавно виявлений протипухлинний засіб, який структурно пов'язаний з кількома іншими сполуками, що виявляють протипухлинну активність, включаючи шартреузін (КТ), хризоміцин V (CV) та М (СМ), гілвокарцин V (GV) та равідомицин (RM). Біохімічні реакції, що призводять до цитотоксичності для більшості цих сполук, чітко не з'ясовані. Є деякі докази того, що GV і СТ зв'язуються з ДНК і що GV є світлочутливим, що спричинює пошкодження ДНК. Тому вчені досліджували вплив цих хімічних речовин на ДНК у клітинах та на плазмідну ДНК рBR322. Використовуючи методи лужного елюювання, виявили, що всі ці сполуки різною мірою спричиняють розрив ДНК в клітинній лінії аденокарциноми легенів людини А549. Крім того, всі або зв'язані з ДНК, або вкладені в них, на що вказує їх здатність змінювати електрофоретичну міграцію ДНК в агарозних гелях. За допомогою аналізу було

виявлено, що EM, CT, CV, CM, GV та RM є потужними інгібіторами каталітичної активності топоізомерази II. Їх порівнювали з відомими інгібіторами топо II теніпозидом (VM-26) та доксорубіцином (DX). EM був найпотужнішим, з ІС₅₀ 0,4 мкмоль/л з послідовністю CV, GV та CT. VM-26 був найменш потужним. З цих результатів було зроблено висновок, що EM, GV, CV, CM і CT здатні інгібувати топо II і що EM є найпотужнішим інгібітором топо II.[18]

Сяочунь Гао разом із дослідниками робили дослідження на актиноміцеті, який позначений штамом BM-17 та виділений із зразка осаду, зібраного в Північному Льодовитому океані. Штам було визначено як *Nocardia* і на основі морфологічних, культурних, фізіологічних, біохімічних характеристик, поряд з аналізом клітинної стінки та аналізом послідовності генів 16S рДНК. Новий вторинний метаболіт N-(2-гідроксифеніл) -2-феназінамін (NHP) та шість відомих антибіотиків були виділені із сольової культури бульйону шляхом послідовного очищення над макропористою смолою D101, силікагелем, колонковою хроматографією Sephadex LH-20 та препаративною ВЕРХ. Хімічні структури сполук з'ясовано на основі спектроскопічного аналізу, включаючи двовимірні ЯМР та дані HR-ESI-MS. Нова сполука продемонструвала значну протигрибкову активність проти *Candida albicans* із значенням МІС 64 мкг/мл і високою цитотоксичністю ракових клітин щодо клітин HepG2, A549, HCT-116 та СОС1.

Цитотоксичну активність визначали за допомогою аналізу набору клітин-8 (ССК-8). В аналізі використовували клітинну лінію гепатоцелюлярної карциноми печінки людини HepG2, епітеліальну клітинну клітину аденокарциноми легенів людини A549, клітинну лінію аденокарциноми товстої кишки людини HCT-116 та клітинну лінію СОС1 раку яєчників людини. Клітини висівали в 96-лункову культуральну пластинку (4×10^3 клітини на лунку) зі 100 мкл модифікованого Дульбекко середовища Ігл (DMEM), що містить 10% FBS, пеніцилін (100 Од/мл) і стрептоміцин (100 мг/мл). Клітини інкубували при температурі 37°C у 5% інкубаторі СО₂ протягом 24 годин. Потім тестові зразки в різних дозах додавали в кожен лунку. Потім планшети інкубували при 37°C протягом 1,5 год. Цисплатин та середовища використовувались як позитивний та негативний контроль відповідно. OD вимірювали при 450 нм. [19]

Сетсуко Кунімото досліджував нові антибіотики під назвою кігаміцин А, В, С, D та Е, які були виявлені з культурального відвару *Amycolatopsis* sp. ML630-mF1 шляхом їх селективної активності проти клітин PANC-1 в умовах голоду. За умови голодування кігаміцини А, В, С та D пригнічували виживання клітин PANC-1 при концентрації в 100 разів нижчій, ніж у звичайній культурі. Кігаміцини демонстрували протимікробну активність щодо грампозитивних бактерій, включаючи стійкий золотистий *стафілокок* (MRSA). Кігаміцин D пригнічував ріст різних клітинних ліній пухлин миші при IC_{50} приблизно 1 мкг/мл. [20]

Чжунхуй Чжен головною метою своєї роботи зробив скринінг актиноміцетів, що мають протипухлинну або антимікробну активність, які були виділені з поверхні епідермісу та кишечника морських рослин та тварин, зібраних з Тайванської протоки, Китай. Протипухлинну активність вивчали методом МТТ, а цільову активність ДНК вивчали методом біохімічної індукції, тоді як антимікробну активність визначали, спостерігаючи пригнічення росту бактерій та грибів. 20,6% морських культур актиноміцетів виявляли цитотоксичну активність на клітинах P388 при розведенні при і нижче 1: 320 та 18,6% на клітинах KB. 2,96% морських культур актиноміцетів виявляли індукуючу активність. Серед усіх морських актиноміцетів, виділених, рід *Micromonospora* має найвищий позитивний показник індукуючої активності. Однак найбільше антимікробної активності було виявлено у роду *Streptomyces*. Ці результати вказують на те, що актиноміцети, пов'язані з морськими організмами, можуть бути перспективним джерелом протипухлинних та протимікробних біоактивних речовин. Цитотоксичну активність ферментаційних бульйонів вивчали методом МТТ. Використовуваними клітинними лініями були клітини мишачого лейкозу P388 та три клітинні лінії раку людини: клітини KB, клітини HLF та клітини CNE. Оптичну щільність (OD) лунок вимірювали за допомогою зчитувача мікропланшетів (M-3550, Bio-Rad) при 595 нм з 655 нм в якості еталону. IC_{50} або ID_{50} визначали як концентрацію лікарського засобу або розведення ферментаційного бульйону, що призвело до принаймні 50% пригнічення росту. Перед тим, як для перевірки протипухлинної активності ферментаційного бульйону використовували тест МТТ, його надійність та чутливість перевіряли семи відомими протипухлинними засобами, блеоміцином, цисплатином, мітоміцином С,

метотрексатом, 5-фторурацилом, цитарабіном гідрохлоридом та сульфатом вінкристину та п'ять антибіотиків - левоміцетин, гентаміцин, лінкоміцин, мікрономіцин та канаміцин та три органічні розчинники без протипухлинної активності - диметилсульфоксид (ДМСО), метанол та етанол. У точковому тесті ВІА три агенти, які, безумовно, взаємодіють з ДНК, блеоміцин, цисплатин та мітоміцин С, були обрані позитивними контролями, тоді як негативні контролі були інгібіторами синтезу білка або іншими препаратами, що мають опосередкований вплив на ДНК, включаючи фторурацил, цитарабін гідрохлорид, вінкристин сульфат та циклофосфамід. [21]

Мюррей досліджував резистентні до пуроміцину (PurR) мутанти клітинної лінії карциноми людини (HeLa), які демонструють значне зниження клітинного поглинання 3Н-пуроміцину та 3Н-дауноміцину, були виділені після одно- та двоступеневого відбору в присутності препарату. Досліджено характер перехресної стійкості цих мутантних клітинних ліній щодо численних протипухлинних препаратів та інших інгібіторів. Мутанти першої, і другої стадії виявляли підвищену стійкість до ряду антиміотичних препаратів (а саме: вінбластину, вінкристину, колхіцину, таксолу та майтанзину), декількох інгібіторів синтезу білка (а саме: халкоміцину, бруцеантину, гаррінгтоніну, гомогаррінгтоніну), велика кількість інтерактивних сполук ДНК (аклациноміцин А, актиноміцин D, адріаміцин, m-AMSA, хромоміцин А3, коралін сульфоацетат, дауноміцин, еліптицин, мітраміцин, мітоксантрон, 5-метоксистеригматоцистин, рубідазон, варіаміцин, VM26 та VP16-213) та ряд інших лікарських засобів, що діють за іншими механізмами (зокрема, антифол Бейкера, ніпридин хлориду та родамін 123). У той час як мутанти першої стадії демонстрували стабільну стійкість до цих препаратів, лінії другої стадії частково поверталися при зростанні в неселективному середовищі. Крім того, лікування цих мутантних ліній нецитотоксичними дозами блокатора кальцієвих каналів верапамілом повернуло або скасувало їх резистентність до вищезазначених препаратів залежно від дози. На відміну від вищезазначених сполук, мутанти PurR не продемонстрували значної перехресної стійкості до великої кількості інших препаратів. Ці дані про перехресну резистентність повинні виявитися корисними

при розробці відповідних комбінацій препаратів, до яких клітинна резистентність не могла б розвиватися легко.[22]

Річардсон разом із співавторами визначали нову сполуку-лісоклінолід. Це невеликий незотистий лактон, виділений із морської асцидіани. Попередні дослідження лісокліноліду (виділеного з гриба та актиноміцету) виявили різну активність щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій. У цьому дослідженні лісоклінолід зміг інгібувати ріст клітин у різних лініях пухлини ссавців із середнім значенням ІС асцидійської колінної чашечки *Lissoclinum*₅₀395 нМ (визначається конверсією МТТ після 48-годинної обробки). Обробка клітин пухлини товстої кишки людини НСТ 116 за допомогою 2,4 мкМ лісокліноліду призвела до сильної зупинки G₂/М фаза клітинного циклу після 24-годинного впливу. Дочірня клітинна лінія без браку p53 показала однакову відповідь, тоді як спостерігалось незначне збільшення цитотоксичності щодо нульової клітинної лінії p21. Хоча лікування 2,4 мкМ лісоклінолідом не призвело до апоптозу через 48 годин, ця зупинка не була оборотною при спробі вимити препарат. Здається, механізм дії не включає тубулін, убіквітин-специфічні ізопептидази, p53 або p21. Порівняльний аналіз на пухлинній панелі клітинної лінії NCI 60 виявив помірну селективність щодо клітинних ліній пухлини товстої кишки.[23]

К. Вельцел у своєму дослідженні виявив новий потужний протипухлинний засіб зі змішаною полікетидно-вуглеводною структурою, вироблений *Streptomyces chartreusis*. Три кластера II полікетидсинтаза (ПКС) були ідентифіковані з *S. chartreusis* HKI-249. Молекулярний аналіз локусу ~37 kb та з'ясування структури лінійного проміжного шляху від інженерного мутанта виявляє, що походить із полікетиду типу антрацикліну. Крім того, полікетид-аглікон-чартарин, який є важливим для протипухлинної активності, має унікальну пентациклічну структуру біс-лактону. Аналіз кластера генів *cha* та виділення резоміцину С з раціонально розробленого мутанта довів, що чартарин походить від антрациклічного попередника шляхом окисної послідовності. Вчені представили біосинтетична модель, яка обґрунтовує нерегулярну схему мічення ацетату шартреузину. Враховуючи, що в природі реалізовано лише відносно мало кільцевих полікетидних систем, шлях шартреузину представляє ще один важливий приклад

розробки незвичних моделей циклізації. Таким чином, включаючи незвичайні кільцеподібні оксидоредуктази та передбачувану 2-глікозилтрансферазу, не лише інтригують з механістичної точки зору, але також є перспективними кандидатами на комбінаторні біосинтетичні підходи. [24]

Макговрен виявляв значну терапевтичну активність щодо трьох експериментальних пухлин мишей (асцитична Р388, лейкемія L1210 та меланома В16), коли клітинам пухлини вводили ір1 та вводили препарат ір2. У подальших тестах проти лейкемії Р388 активності при застосуванні препарату не спостерігали, sc, або iv Шартреузин дуже повільно всмоктувався з тонкої кишки, що пояснює відсутність активності при введенні перорально. При введенні внутрішньовенно препарат випадав у осад і повільно всмоктувався протягом декількох годин. Сильна активність, що спостерігається цим шляхом, була пов'язана з тривалим контактом препарату з пухлинними клітинами. Подальше розчинення та абсорбція з місця ін'єкції були дуже повільними, а вимірювані рівні в плазмі та тканинах були досить низькими. Екскреція біліарної кислоти шартреузину, переважним шляхом елімінації, була дуже швидкою: 80-100% дози виглядало як незмінений препарат із жовчю протягом 6 годин після внутрішньовенного введення. Швидке виведення жовчі після експеримента менше, ніж необхідні для знищення клітин Р388. Коли лігували жовчні протоки лейкемічних мишей, введених внутрішньовенно, спостерігали терапевтичну активність, що підтверджує, що фізіологічний розподіл шартреузину та робить великий вплив на його терапевтичну користь.[25]

Розділ 2. Похідні штами *Streptomyces* sp.

з протипухлинною активністю

Рак є найбільш часто діагностуваним у світі порівняно з іншими захворюваннями, із пропорційно високим рівнем смертності. Таким чином, пошук нових антиоксидантів та специфічних протипухлинних засобів, які можуть пригнічувати, затримувати або повертати назад розвиток раку, представляє великий інтерес. *Streptomyces* sp. представляє цінний біоресурс біоактивних сполук для майбутнього розвитку хіміопрофілактичних засобів, з особливою перспективою для лікування раку.

Ло Тенг-Херн Тан разом із дослідниками виділив екстракт з *Streptomyces* sp. MUM265 (штам, який був виділений та ідентифікований з мангрового лісу Куала-Селангор, Селангор, Малайзія). Було проаналізовано та виявлено, що штам виявляє антиоксидантні властивості, продемонстровані завдяки здатності до хелатування металів, а також супероксидним аніонам, DPPH та ABTS, що відволікають активність. Це дослідження також показало, що екстракт MUM265 продемонстрував цитотоксичність щодо клітин раку товстої кишки, про що свідчить знижена життєздатність клітинної лінії Сако-2. Лікування екстрактом MUM265 викликало деполяризацію потенціалу мембрани мітохондрій та накопичення клітин subG₁ при аналізі клітинного циклу, припускаючи, що MUM265 чинив індукуючий апоптоз вплив на клітини Сако-2. Цитотоксичність *Streptomyces* sp. MUM265 оцінювали щодо різних клітин раку товстої кишки. Життєздатність клітин після впливу змінних концентрацій екстракту оцінювали за допомогою аналізу МТТ. Клітини CCD-18Co були включені для оцінки токсичності екстракту щодо нормальних клітин, що послужило мірою селективності екстракту ракових клітин проти нормальних клітин, ключовою та дуже бажаною якістю будь-якого хіміотерапевтичного агента. CCD-18Co - це клітинна лінія фібробластів людини, виділена із нормальної тканини товстої кишки, і широко застосовується як нормальний контроль у дослідженнях раку.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Терещук Д.О.				Розділ 2. Похідні штами <i>Streptomyces</i> sp. з протипухлинною активністю	Літ.	Арк.
Консульт.							
Керівник	Станікова О.В.					24	177 ₂₅
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стабніков В.П.						

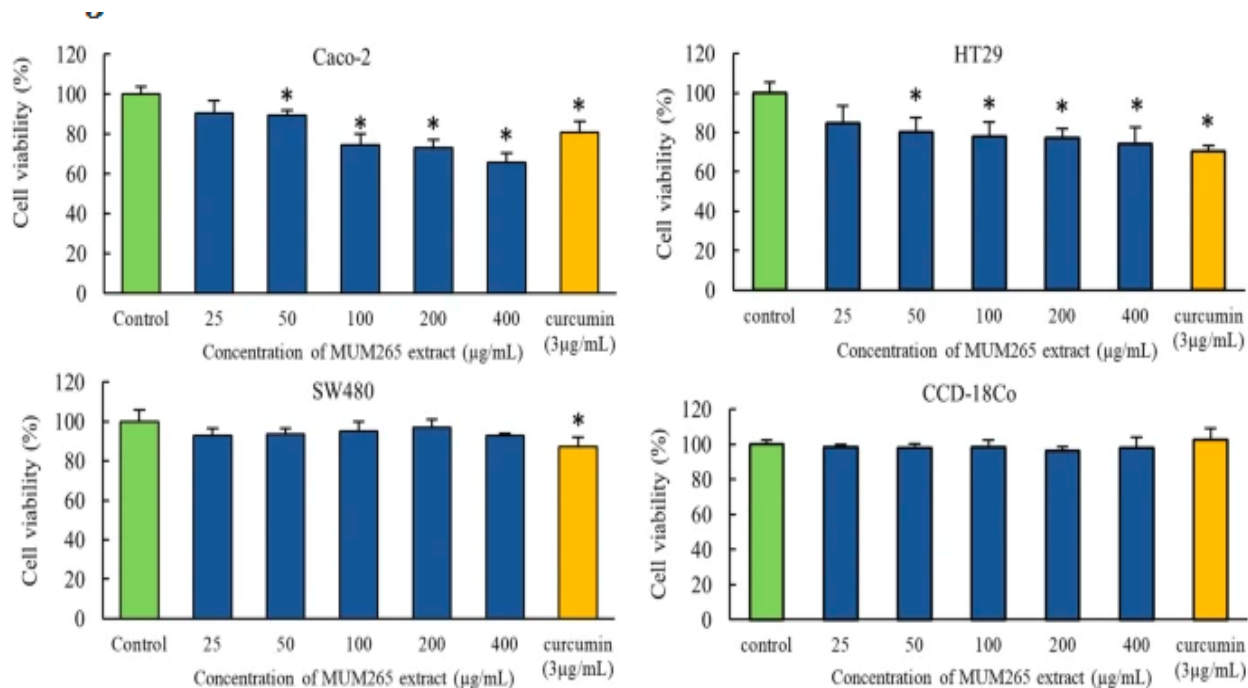


Рис. 1. Цитотоксичність *Streptomyces* sp. Екстракт MUM265 проти клітинних ліній раку товстої кишки людини.

Цитотоксичність екстракту MUM265 демонструє життєздатність клітин кожної клітинної лінії товстої кишки після впливу екстракту MUM265 у діапазоні кінцевих концентрацій протягом 72 годин. Тест на цитотоксичність показав, що *Streptomyces* sp. MUM265 у концентраціях від 50 до 400 мкг/мл призвів до значного зниження життєздатності клітин як HT29, так і Caco-2 клітин. Caco-2 був найбільш чутливим до *Streptomyces* sp. MUM265 серед випробовуваних клітинних ліній, як визначено за найвищим зниженням життєздатності клітин Caco-2 $p < 0,05$ і навпаки, SW480 не був чутливим до *Streptomyces* sp. MUM265.[26]

Кок-Ган Чан разом із співавторами досліджували штам *Streptomyces*, MUM256, що був виділений із мангрового ґрунту Танджунг-Лумпур в Малайзії. Характеристика штаму показала, що він має властивості, що відповідають властивостям представників роду *Streptomyces*. Для вивчення потенційної біоактивності екстракт ферментованої бульйонної культури MUM256 готували методом екстракції органічним розчинником. Активність DPPH та SOD використовувалась для вивчення антиоксидантної здатності, і результати показали ефективність MUM256 у активності знешкодження супероксидних аніонів залежно від дози. Цитотоксичність екстракту MUM256 визначали за допомогою аналізу життєздатності клітин на 8 різних панелях клітинних ліній раку людини. Серед усіх

перевірених ракових клітин НСТ116 був найбільш чутливим до лікування екстрактом. При найвищій концентрації випробуваного екстракту, результат показав 2,3-, 2,0- та 1,8-кратно вищий інгібуючий ефект проти НСТ116, НТ29 та Сасо-2 відповідно у порівнянні з нормальною клітинною лінією. Цей результат продемонстрував, що екстракт MUM256 був вибірково цитотоксичним щодо клітинних ліній раку товстої кишки. Для того щоб визначити складові, відповідальні за його біоактивність, екстракт потім піддавали хімічному аналізу за допомогою ГХ-МС. Результатом аналізу було виявлення хімічних складових, включаючи фенольні та піролопіразинові сполуки, які можуть бути відповідальними за спостережувану антиоксидантну та протиракову діяльність. Виходячи з результатів цього дослідження, наявність біоактивних компонентів в екстракті MUM256 може бути потенційним джерелом для розвитку антиоксидантних та хіміопрофілактичних засобів і Сасо-2 відповідно у порівнянні з нормальною клітинною лінією. Цей результат продемонстрував, що екстракт MUM256 був селективно цитотоксичним щодо клітинних ліній раку товстої кишки. Для того щоб визначити складові, відповідальні за його біоактивність, екстракт потім піддавали хімічному аналізу за допомогою ГХ-МС. Результатом аналізу було виявлення хімічних складових, включаючи фенольні та піролопіразинові сполуки, які можуть бути відповідальними за антиоксидантну та протипухлинну діяльність.[27]

Н. Імамура здійснював біосинтетичне дослідження антибактеріальних та протипухлинних антибіотиків віноміцинів A_1 та B_2 , вироблених *Streptomyces matensis subsp. vineus*, проводили шляхом маркування експериментів з ацетатом натрію з подальшою ЯМР-спектроскопією. Результати показують, що бензантрахіноновий хромофор 1 отримують з метаболіту декацетату з декарбоксилюванням на кінці карбоксилу, і що 2 утворюється через розщеплення зв'язок СС 1. Виділення рабеломіцину з ферментаційного бульйону того самого штаму свідчить про тісний біосинтетичний взаємозв'язок між простими бензантрахіноновими антибіотиками, такими як рабеломіцин, тетрангоміцин, аквааміцин, С- глікозильований бензантрахінон та віноміцини. Ці біосинтетичні дані спонукали вчених переглянути раніше опубліковану структуру антибіотика SS-228Y.[28]

У своєму дослідженні Карлос Олано виявив, що ареніколід А виявляє помірну цитотоксичність щодо клітинної лінії товстої кишки людини НСТ-116 з IC_{50} 30 мкг/мл. Два біциклічні полікетиди, салінікетал А і В, також були виділені з одного штаму *S. arenicola*. Використовуючи культури клітин карциноми сечового міхура Т24 у поєднанні з терефталевою кислотою, потужним промотором пухлини, що індукує орнітиндекарбоксилазу (ODC), виявили, що салінікетали інгібують індукцію ODC зі значеннями IC_{50} 1,95 та 7,83 мкг/мл відповідно. ODC, важлива мішень для хіміопрофілактики раку, є спрямованою транскрипційною мішенню онкогену *тусі* надмірно експресується в різних пухлинних клітинах. Ця сполука виявляла цитотоксичну активність проти лейкозу мишей Р-388 та недрібноклітинних клітин А-549 легенів людини, аденокарциноми товстої кишки НТ-29 та клітинних ліній меланоми MEL-28. Активність щодо клітинної лінії Р-388 була на чотири порядки вищою, ніж активність проти клітинних ліній А-549, НТ-29 та MEL-28. Халькоміцин, 16-членний макролід, виробляється *Streptomyces* sp. M491, ізольований від узбережжя Циндао (Китай). Крім того, халькоміцин та сполучна сполука халькоміцин В були виділені із штаму *Streptomyces* B7064, виявленого в відкладах мангрових заростей на Гаваях. Встановлено, що халькоміцин інгібуює синтез білка в клітинній лінії карциноми шийки матки людини HeLa. Кластер генів біосинтезу цієї сполуки був виділений та охарактеризований з *S. bikiniensis*. Aureoverticillactam - це 22-членний макроциклічний лактам, що продукується *S. aureo-verticillatus* NPS001583, ізольований від морських відкладень. Було виявлено, що ауреовертицилактam володіє помірною інгібуючою активністю до колоректальної аденокарциноми людини НТ-29, лейкозу та клітинних ліній В16F10 миші.[29]

В. М. Мілне виділив тридцять два штами актиноміцетів із зразків осаду з 12 різних місць у Лагунській лагуні та ідентифіковані за допомогою стандартних фізіологічних та біохімічних процедур, а також аналізу послідовності генів 16S рДНК. Вторинні метаболіти виділяли із штамів та їх протипухлинну активність на K562 (гострий мієлоцитарний лейкоз людини), HeLa (рак шийки матки), AGS (шлунковий тракт людини), MCF-7 (аденокарцинома молочної залози) та HL-60 (гострий промієлоцитарний лейкоз людини) визначали клітинні лінії. Метаболічні

екстракти виявляли цитотоксичність зі значеннями IC₅₀ в діапазоні від 0,030 мг/мл до 4,4 мг/мл. *Streptomyces bingchenggensise* екстракт ULS14 був цитотоксичним щодо всіх клітинних ліній. Екстракція та очищення метаболічних екстрактів із цього штаму, керована біоактивністю, дала дві очищені протипухлинні сполуки: ULDF4 та ULDF5. [30]

Дон Йок Шін виділив з ліпофільного екстракту *Streptomyces sp.* SF2583, стрептохлорин та привернув велику увагу завдяки своїм різноманітним фармакологічним властивостям, таким як антибіотична, протиалергічна, протипухлинна та протизапальна активність. Для ефективного отримання стрептохлорину з продукуючого штаму *Streptomyces sp.* SYYLWHS-1-4, вчені розробили комбінований метод, використовуючи високошвидкісну протитоксову хроматографію (HSCCC). У процесі ферментації використовували RSM для оптимізації стану для ефективного накопичення стрептохлорину. Під час процесу очищення проводили препаративне розділення HSCCC із застосуванням системи двофазного розчинника петролейний ефір-етилацетат-метанол-вода (9: 0,8: 5: 5, об / об / об / об), де 300 мг сирової проби давали 16,5 мг стрептохлорину з чистотою понад 95%, визначеною UPLC. Отже, комбінований метод забезпечив здійсненню стратегію високоефективного приготування стрептохлорину, який забезпечував надходження великої кількості стрептохлорину для фармакологічних оцінок *in vivo* або інших вимог. 5 мг стрептохлорину з чистотою понад 95%, визначеною UPLC. Отже, комбінований метод забезпечував здійсненню стратегію високоефективного приготування стрептохлорину, який забезпечував надходження великої кількості стрептохлорину для фармакологічних оцінок *in vivo* або інших вимог.[31]

С. Джеміма Нейн у дослідженні за головну мету поставив оцінка біоактивних властивостей неочищеного екстракту етилацетату *Streptomyces parvulus* VITJS11 з метою оцінки їх терапевтичного потенціалу. Біологічну активність екстракту етилацетату перевіряли щодо грибкових та бактеріальних збудників. Потенціал знешкодження вільних радикалів сирового екстракту визначали методом DPPH. Хімічно-профілактичні властивості екстракту етилацетату *S. parvulus* VITJS11 досліджували методом МТТ на клітинах НерG2. Морфологічні,

фізіологічні та біохімічні властивості штаму *S. parvulus* VITJS11 підтверджено звичайними методами. Генотипічну характеристику проводили з використанням часткової ампліфікації та секвенування 16S r-ДНК. Справжність неочищених хімічних речовин визначалася GC-MS. Етилацетатний екстракт VITJS11 демонстрував максимальну протигрибкову активність щодо трьох видів *Aspergillus* та помітну антибактеріальну активність щодо двох грампозитивних та грамнегативних бактерій при 20 мг/мл. Антиоксидантний потенціал неочищеного екстракту виявляв сильну знижувальну енергетичну активність при 5 мг/мл із 85% інгібуванням, і цитотоксичний ефект був виявлений з IC_{50} з 500 мкг/мл на клітинних лініях HepG2. Аналіз GC-MS та хроматограма виявили 16 піків, що вказує на наявність біоактивних компонентів, які включали кілька важливих органічних сполук, а саме 9- (2', 2'-диметилпропаноїлгідрозоно) -3,6-дихлор-2,7-Біс- [2-(діетиламіно) -етокси] фтор (23,1) дотріаконтілпентафторпропіонат, (25,0) октадеканова кислота, (20,0); Транс-2-метил-4-н-бутилтіан, S, S-діоксид. (19,0). Результати показали користь екстракту етилацетату з *S. parvulus* VITJS11 для лікування мікробних інфекцій та показали їх широкий спектр активності з корисними достоїнствами для терапевтичного використання.[32]

Йошіхару Мідзуї у своєму дослідженні виявив сім нових 12-членних макролідів, пладієноліди від А до G, вид *Streptomyces platensis* Mer-11107, з пладієнолідом В, який найбільш сильно інгібує експресію VEGF, спричинену гіпоксією, і проліферацію клітинної лінії раку U251. Дослідження, що інгібують ріст, за допомогою 39-клітинної панелі скринінгу лікарських засобів продемонстрували, що пладієнолід В має сильну протипухлинну активність *in vitro*. Аналіз порівняння виявляє, що він має унікальний протипухлинний спектр, який відрізняє його від протипухлинних препаратів, які зараз використовуються в клінічному застосуванні. Цей результат свідчить про те, що пладієнолід В має новий механізм дії. Була проведена серія досліджень ксенотрансплантатів для оцінки потенції пладієнолідів *in vivo*. Пладієнолід В сильно пригнічував ріст пухлини на моделях ксенотрансплантата. У найбільш чутливій моделі, використовуючи ксенотрансплантати BSY-1.[33]

Джеміма Найн Сельвакамур вивчав антибактеріальний, протипухлинний потенціал та виявив ефективну активність проти *Shigella flexneri* (MTCC No: 1457) (22 мм), *Salmonella typhi* (MTCC No: 1167) (23 мм), *Escherichia coli* (MTCC No: 1588) (22 мм), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC No: 4676) (22 мм) при концентрації 20 мг/мл. Здатність до вилучення екстракту визначали за допомогою аналізу 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH), що виявляє його 95% інгібування при концентрації 5 мг/мл. Клітинна лінія гепатоцелюлярних ракових клітин (HepG2) була використана для оцінки цитотоксичності за допомогою аналізу броміду 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл тетразолію. Екстракт продемонстрував максимальне інгібування при IC_{50} 250 мкг / мл при 53,6% життєздатності клітин. Найвища однорідність послідовності гена 16S рРНК спостерігалася на 99%, як і у нового штаму *S. spectabilis* S3-1. Хімічні компоненти сирого екстракту VITJS10 були виявлені з 37 хімічними складовими. Однак було виявлено три основні сполуки, а саме сірчисту кислоту, 2-етилгексилтридециловий ефір, фенол, 2,4-біс (1,1-диметилетил) та транс-2-метил-4-н-пентилтіан, S, S-діоксид. Отже, це дослідження обґрунтовує переважні побічні докази як найбільш біоактивних метаболітів морського походження, які потенційно можуть використовуватися у фармацевтичній промисловості. [34]

Хефа Мангсіра Кемунг разом із співавторами у своєму дослідженні *Streptomyces* sp. штам MUSC 14, попередньо виділили із штату Паханг на півострові Малайзія та вивчали його потенціал у виробленні антиоксидантних метаболітів. Ідентичність *Streptomyces* sp. штам MUSC14 відповідав генотиповим та фенотиповим характеристикам роду *Streptomyces*.

Антиоксидантний потенціал *Streptomyces* sp. штам MUSC 14 визначали шляхом скринінгу його метанольного екстракту проти наборів антиоксидантних аналізів. Результати вказували на *Streptomyces* sp. штам MUSC 14, що виявляє сильну антиоксидантну активність відносно ABTS, вільних радикалів DPPH та хелатуючої активності металів - $62,71 \pm 3,30\%$, $24,71 \pm 2,22\%$ та $55,82 \pm 2,35\%$, відповідно. Крім того, спостерігалася висока кореляція між загальним вмістом фенолу та антиоксидантною активністю з $r = 0,979$, $r = 0,858$ та $r = 0,983$, що представляє ABTS, DPPH та хелат металів, відповідно. Загалом, це дослідження

показує, що *Streptomyces* sp. штам MUSC має потенціал для утворення антиоксидантних метаболітів, які можуть бути надалі використані для терапевтичного застосування.[35]

Джоді Воан-Фей Закон досліджував *Streptomyces colonosanans* MUSC 93J^T, новий штам, виділений із мангрових лісових ґрунтів, розташований у Саравака, Малайзія. Було зазначено, що бактерія є грампозитивною та утворює світло-жовтий повітряний та яскраво-жовтий субстратний міцелій на агарі ISP 2. Поліфазний підхід був використаний для визначення таксономії штаму MUSC 93J^T, і штам продемонстрував ряд філогенетичних та хемотаксономічних властивостей, що відповідають властивостям представників роду *Streptomyces*. Філогенетичний аналіз та аналіз послідовності гена 16S рРНК показав, що близькоспоріднені штами включають *Streptomyces malachitofuscus* NBRC 13059^T (схожість послідовностей 99,2%), *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^T (99,1%) та *Streptomyces phaeoluteichromatogenes* NRRL 5799^T (99,1%). Значення спорідненості ДНК-ДНК між MUSC 93J^T та штамами, що мають близький тип, коливалися від $14,4 \pm 0,1$ до $46,2 \pm 0,4\%$. Порівняння відбитків пальців BOX-PCR показало, що MUSC 93J^T має унікальний профіль ДНК. Геном MUSC 93J^T складається з 7 015 076 bp. Вміст G + C у ДНК був визначений 69,90 мол.%. Екстракт штаму MUSC 93J^T було продемонстровано, що він виявляє потужну антиоксидантну активність за допомогою аналізів ABTS, металів хелатування та SOD. Цей екстракт також виявляє протиракову активність проти клітинних ліній раку товстої кишки людини без значного цитотоксичного ефекту проти нормальних клітин товстої кишки людини. Крім того, хімічний аналіз екстракту ще більше підкреслює, що штам виробляє метаболіти, пов'язані з хіміопрофілактикою. На основі цього багатофазного дослідження MUSC 93J^T зроблено висновок, що цей штам являє собою новий вид, для якого назва *Streptomyces colonosanans* sp. пропонується. Тип штаму - MUSC 93J. Це дослідження показало, що MUSC 93J^T заслуговує віднесення до нового виду роду *Streptomyces* на основі аналізів поліфазного підходу. Оскільки штам MUSC 93J^T є новим видом *Streptomyces*, було б цікаво дослідити антиоксидантний потенціал цього штаму. Отже, штам додатково досліджували на його антиоксидантний потенціал за допомогою аналізів ABTS, металів хелатування

та SOD. Згідно з результатами антиоксидантних аналізів можна помітити, що екстракт MUSC 93J^T виявляв значну активність до знешкодження вільних радикалів. В аналізі ABTS катіон радикала ABTS був отриманий в результаті реакції між сильним окислювачем персульфатом калію з сіллю ABTS та здатністю антиоксиданта знешкоджувати радикал ABTS, що утворюється у водній фазі.[36]

С. Сіддхарт у своєму дослідженні *Streptomyces* sp.S2A був виділений із затоки Маннар, Індія. Ідентифікацію проводили за допомогою аналізу 16S рРНК. Біоактивні метаболіти екстрагували методом екстракції розчинником. Метаболіти аналізували на антагоністичну активність щодо бактеріальних та грибових патогенів, інгібування ферментів α -глюкозидази та α -амілази, антиоксидантну активність та цитотоксичну активність щодо різних клітинних ліній. Екстракт актинобактерій виявляв значну антагоністичну активність щодо чотирьох грампозитивних та двох грамнегативних патогенів. Також спостерігалось відмінне зниження росту грибових збудників. Мінімальна інгібуюча концентрація частково очищеного екстракту (ЗІЗ) була визначена як 31,25 мкг/мл проти *Klebsiella pneumoniae*, 15,62 мкг/мл проти *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus cereus*. Найнижчий коефіцієнт поглинання спостерігався проти *Micrococcus luteus* як 7,8 мкг/мл. МІК проти грибових патогенів визначали як 62,5 мкг/мл проти *Bipolaris maydis* та 15,62 мкг/мл проти *Fusarium moniliforme*. Інгібуючий потенціал α -глюкозидази та α -амілази фракцій проводили методом мікротитрування. ІС₅₀. Встановлено, що значення активної фракції для інгібування α -глюкозидази та α -амілази становить 21,17 мкг/мл та 20,46 мкг/мл відповідно. Спостерігали антиоксидантну активність частково очищеного екстракту (ЗІЗ) (DPPH, ABTS, FRAP та металохелатуюча активність), а також виявили значну цитотоксичну активність щодо клітинних ліній HT-29, MDA та U-87MG. Аналіз сполук проводили за допомогою газової хроматографії-мас-спектрометрії (GC-MS) і отримували три складові; піроло [1 – а] піразин-1,4-діон, гексагідро-3- (2-метилпропіл) -, що є основним компонентом (80%). В цілому, штам має широкий спектр антимікробної, інгібуючої ферменти, антиоксидантної та цитотоксичної активності, що забезпечує продукцію значних біоактивних метаболітів як потенційних фармакологічних агентів.[37]

П. Лаліта досліджувала морські бактерії, штам MB30, виділена з глибоководного осаду Бенгальської затоки, Індія, виявляла антимікробну активність проти патогенних бактерій людини. На основі гомології послідовності 16S рРНК та подальшого аналізу філогенетичного дерева, штам MB30 було визначено як *Staphylococcus sp.* Біоактивний метаболіт, продукований штамом MB30, очищали за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі та препаративною ВЕРХ. Очищений метаболіт додатково характеризували за допомогою FT-IR, LC-MS та ЯМР-аналізів. На основі спектроскопічних даних метаболіт був ідентифікований як пірол (1, 2, а) піразин 1, 4, діон, гексагідро 3- (2-метилпропіл) (PPDHMP). PPDHMP виявляв *in vitro* протираковий потенціал проти ракових клітин легенів (A549) та шийки матки (HeLa) залежно від дози з концентрацією IC_{50} $19,94 \pm 1,23$ та $16,73 \pm 1,78$ мкг/мл (-1) відповідно. Фарбування акридиновим оранжевим (АО) / бромідом етидію (ЕВ) та 4,6-діамідино-2-феніліндол дигідрохлоридом (DAPI) концентрації IC_{50} у лікуваних PPDHMP ракових клітинах демонструвало цілий ряд морфологічних змін, таких як ядерна конденсація, усадка клітин і формування апоптотичних тіл. Ліковані PPDHMP ракові клітини викликали прогресивне накопичення фрагментованої ДНК залежно від часу. На основі проточного цитометричного аналізу стало очевидним, що сполука також була ефективною для зупинки клітинного циклу у фазі G1. Далі аналіз підтвердив знижену регуляцію цикліну-D1, циклін-залежної кінази (CDK-2), антиапоптотичних білків сімейства Bcl-2 (Bcl-2 та Bcl-xL), активації каспаз-9 та 3 з розщепленням ПАРП. Ліковані PPDHMP ракові клітини також показали пригнічення міграції та інвазійну здатність ракових клітин. [38]

М. Лю вивчав нові, біоактивні вторинні метаболіти. Не став винятком і новий штам, відомий як MUSC 136^T (DSM 100712^T=MCCC 1K01246^T), який був виділений із лісових ґрунтів Малайзії. За оцінкою поліфазного підходу, його таксономія показала цілий ряд філогенетичних та хемотаксономічних властивостей, що відповідають роду *Streptomyces*. Філогенетично найвища схожість була із *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^T (99,6%) разом із двома іншими штамми (> 98,9% подібності послідовності). Зв'язок ДНК – ДНК між MUSC 136^T і ці типи штамів становили від $22,7 \pm 0,5\%$ до $46,5 \pm 0,2\%$. Загалом дослідження

багатофазного підходу показали, що цей штам являє собою новий вид, для якого пропонується назва *Streptomyces malaysiense* sp. Потенційну біоактивність цього штаму досліджували за допомогою антиоксидантних та цитотоксичних аналізів. Що цікаво, MUSC 136^T виявляв сильну антиоксидантну активність, як було оцінено групою антиоксидантних аналізів. Також було виявлено, що він має високий цитотоксичний ефект проти клітин НСТ-116, який, ймовірно, опосередковується зміною рівня білка p53 та внутрішньоклітинного рівня глутатіону. Хімічний аналіз екстракту за допомогою GC-MS додатково підтверджує, що штам виробляє метаболіти, пов'язані з хіміопрофілактикою. Цитотоксичний потенціал екстракту MUSC 136^T був перевірений на кілька ракових клітин, отриманих людиною (НСТ-116, НТ-29, Са Ski та А549). Встановлено, що екстракт є найбільш токсичним щодо НСТ-116 з життєздатністю клітин $48,8 \pm 4,1\%$ при дослідженні при 400 мкг/мл. Крім того, дозозалежний ефект також спостерігався під час тестування на клітини НСТ-116. На другому місці після клітин НСТ-116, клітинної лінії раку шийки матки, Са Ski продемонстрував зниження життєздатності клітин до $55,6 \pm 1,2\%$ після обробки екстрактом MUSC 136^T. З іншого боку, виявлено, що клітинна лінія раку легенів А549 є найменш чутливою до лікування екстрактом життєздатністю клітин при $67,1 \pm 0,6\%$. Цікаво, що різний рівень активності спостерігався серед клітин раку товстої кишки (НСТ-116 та НТ-29) з більш високим цитотоксичним ефектом проти клітин НСТ-116.[39]

Порівняльна характеристика протипухлинної активності актиноміцентних штамів

Табл. 2.1

№	Продукент:	Джерело вуглецю та нітрогену:	Умови культивування:	Продукт:	Вихід цільового продукту, г/л:	Лінії раку:	Література:
1	<i>Streptomyces</i> sp. MUM26 5	Оцтова кислота Фруктоза Інозин	pH=6, t=28°C, T=100	Екстракт MUM265	0,4	Клітини раку товстої кишки	[26]
2	<i>Streptomyces</i> sp DY115-21	Глюкоза - 70, Фтотриптон, Дріжджовий екстракт	pH=6,6 t=28°C, T=196	Екстракт DY115-21	3	Карциноми товстої кишки	[27]
3	<i>Streptomyces</i>	глюкоза 2,	pH=6,4,	Віноміцицин	2,04	карцинома	[28]

	sp. IB2016I 91-2A	гліцерин 40, пептон 5 г, екстракт дріжджів 5	t=28°C, T=96	ів А ₁ та В ₂		легенів	
4	<i>S. arenicola</i> C NR-005	Меляса-40, пептон-5,0, Na ₂ SO ₄ -3	pH=6,6, t=28°C, T=120	ареніколід А Мануміцин	3,3	аденокарци номи товстої кишки людини НСТ-116; карциноми сечового міхура T24	[29]
5	<i>S. abyssi</i> MT1. 1	глюкоза 4 екстракт дріжджів 4 г	pH=7, t=28°C, T=100	Дермакозин М	4	клітинний ліній раку підшлунко вої залози	[30]
6	<i>Streptomyces</i> sp. KORDI- 3238	Глюкоза 60 Кізеїн 4 Фітопептон 5	pH=7, t=30°C, T=120	хінікоміцин А та В	3,7	Закінчення таб.2.1	
						молочної залози, клітинної лінії меланом	
7	<i>Streptomyces</i> <i>parvulus</i> VITJS11	Казеїн 4, солодовий екстракт: 10 г, декстроза	pH=7,2, t=27°C, T=140	Екстракт VITJS11	5	Клітини HepG2	[32]

Розділ 3. *Streptomyces* sp. MWW064 та інші актинобактерії продуценти ракіцидину

Хисаюкі Комакі досліджував *Streptomyces* sp. MWW064, що синтезує протипухлинний циклічний депсипептид ракіцидин D. Вчені визначили біосинтетичний шлях на основі біоінформаційного аналізу та експериментально довели, що пентадієноїлова одиниця в ракіцидинах походить від серину та малонату. Ракіцидин D є інгібітором інвазії клітин пухлини, виділеного з культурального відвару штаму актиноміцетів MWW064 роду *Streptomyces*. На сьогоднішній день повідомляється про п'ять споріднених ракіцидинів А, В та Е від *Micromonospora* та ракіцидинів С та D від *Streptomyces*. Ракіцидини поділяють 15-членну циклічну депсипептидну структуру, що включає три амінокислоти та жирну кислоту, модифіковану гідрокси- та метиловими замінами. Найбільш інтригуючою частиною ракіцидинів є рідкісна незвична амінокислота 4-аміно-2,4-пентадієноат (APDA), яка присутня лише в обмеженому діапазоні вторинних метаболітів актиноміцетів та мікротермоліду. Незважаючи на дефіцит одиниці APDA в природі, про її біосинтез нічого не відомо. Було визначено біосинтетичні гени ракіцидину D, але дані неповні. Отже, біосинтез ракіцидинів насправді досі незрозумілий. У цьому дослідженні вчені провели секвенування цілого геному штаму MWW064, щоб з'ясувати біосинтетичний механізм ракіцидину D.[40]

Ясухіро Ігарасі здійснював дослідження на злоякісних пухлинах та визначив, що метастазування пухлини є основною причиною смерті онкологічних хворих. Це процес, за допомогою якого пухлинна клітина залишає первинну пухлину, поширюється на віддалену ділянку через систему кровообігу і встановлює вторинну пухлину. Під час метастатичного каскаду пухлини повинні пройти через бар'єри позаклітинного матриксу, щоб здійснити метастазування. Хоча генетична основа туморогенезу може сильно відрізнятися, етапи, необхідні для метастазування, подібні для всіх пухлинних клітин. Тому переривання метастазування є перспективним підходом до лікування раку різного генетичного походження.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. <i>Streptomyces</i> sp. MWW064 та інші актинобактерії продуценти ракіцидину.	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Терещук Д.О.						36	177
Консульт.								
Керівник	Станікова О.В.							
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П					Кафедра БТМ		

У даному дослідженні було здійснено пошук сполук з мікробних вторинних метаболітів, ракіцидину D був виділений з культурального бульйону штаму актиноміцетів роду *Streptomyces*. На сьогоднішній день вчені встановили про три споріднених речовини, ракіцидини A і B від *Micromonospora* та ракіцидин C від *Streptomyces*. Ракіцидини містять рідкісну незвичну амінокислоту, 4-аміно-2,4-пентадієноат, яка виявлена лише у вторинних метаболітах актиноміцетів. Продукуючий штам *Streptomyces* sp. MWW064 був виділений із зразка морського осаду, відібраного в провінції Самут Сакхон, Таїланд. Штам культивували в стандартному середовищі для актиноміцетів і весь бульйон культури екстрагували 1-бутанолом. Екстракт виявляв інгібуючу активність щодо інвазії клітин пухлини в матригель, відновлений білок позаклітинного матриксу. Фракціонування екстракту за допомогою біологічного аналізу призвело до виділення нової сполуки, ракіцидину D.[41]

Орлова Т. І. виконувала дослідження для виявлення продуцентів метаболітів з конкретними бажаними біохімічними активностями. Так, продуцент аціларіламідів отриманий при скринінгу актиноміцетів на клітини раку легенів. Діазахіно-мицин Б-О отримані при скринінгу морських актиноміцетів на стійкі до цис-платини ракові клітини яєчників. Скринінг мікроорганізмів - продуцентів гіалуронідази проводився з використанням мембранної фракції СБ44-клітин і флуоресцентних кон'югатів. Для швидкого скринінгу та ідентифікації метаболітів запропоновано використовувати високоефективну рідинну хроматографію в поєднанні з мас-спектрометрією. Цей же метод може бути застосований при підборі оптимальних умов культивування. Стрептоміцетами - продуцент інгібітора міграції ракових клітин ракіцидина D виділений з вод Червоного моря. Інгібітор є циклодепсіпентапептид. Серед утворюють його амінокислот одна містить непередельную зв'язок, і одна - складна аміно-окси-кислота. Речовина перешкоджає просуванню ракової клітини в міжклітинної рідини.[42]

Шигеру Кітані разом з вченими виділив новий циклічний депсипептид, ракіцидин F (1), разом із відомим сполукою ракіцидином C (2), був отриманий із ферментаційного бульйону штаму актиноміцетів морської губки *Streptomyces*

sp. GKU 220. Їх структури були з'ясовані шляхом інтерпретації спектроскопічних даних HRFABMS та ЯМР. Ракіцидин F (1) продемонстрував інгібуючу активність проти бактерій.[43]

Шон Р. Джонсон виділив сімдесят чотири метаболіти можна було ідентифікувати за допомогою збігів спектрів MS/MS. Суругамід A та лейпептин, обидва інгібітори протеази, які раніше були виділені з *Streptomyces sp.*, які можуть бути ановані до конкретних кластерів *Streptomyces*. Ракіцидин A і B був віднесений до невеликого кластеру з лише трьох вузлів, які були розподілені між кількома ізолятами *Мікромоноспори* та *Streptomyces*, ці сполуки виявляють цитотоксичні та протипухлинні властивості. Крім того, загальний актиноміцет для придбання заліза, десферріюксамін B, був пов'язаний із загальним кластером актиноміцетів. [44]

Цзінь-Фен Ху разом з вченими виділив ракіцидин A - циклічний депсипептид, який виявляє унікальну інгібуючу активність росту проти хронічних стовбурових клітин мієлолейкозу. Крім того, ракіцидин A має п'ять хіральних центрів із невідомим стереохімічним призначенням, і, отже, може бути представлений одним із 32 можливих стереоізомерів. Для прогнозування найбільш вірогідної стереохімії ракіцидину A були застосовані розрахунки та структурне порівняння з природними циклічними депсипептидами. Потім синтез запропонованої структури був завершений і підкреслений створенням стерично утрудненого ефірного зв'язку (C1-C15) шляхом трансацилювання з легко встановленого ізомеру (C1-C13). Аналітичні дані синтетичної мішені відповідали даним природного ракіцидину A, і тоді абсолютна конфігурація ракіцидину A була призначена як 2 *S*, 3 *S*, 14 *S*, 15 *S*, 16 *R*. Це дослідження пропонує стратегії для визначення невідомих хіральних центрів в інших циклічних депсипептидах, таких як ракіцидин B, C, D, BE-43547 та вініламіцин, та полегшує дослідження ракіцидину A як протиракового агента стовбурових клітин.[45]

Цзянь Чен досліджував протокову аденокарциному підшлункової залози (PDAC), що є високоагресивною злоякісною пухлиною і стійкою до більшості методів лікування. Стовбурові клітини раку підшлункової залози (PCSC) відігравали вирішальну роль у регулюванні прогресування PDAC, метастазування та

стійкості до лікарських засобів. Отже, орієнтація на PCSC вважається перспективною стратегією лікування PDAC. Серію з двадцяти аналогів ракіцидину А було синтезовано за допомогою комбінаторної стратегії та оцінено на їх анти-PDAC-активність, а також обговорено взаємозв'язок між структурою та активністю.

У високометастатичній клітинній лінії раку підшлункової залози ASPC-1 з'єднання 32g показало приблизно в 4 рази більшу ефективність ($IC_{50} = 0,022$ мкМ), ніж ракіцидин А ($IC_{50} = 0,082$ мкМ) при стані гіпоксії та 12 складок селективності гіпоксії ($IC_{50} = 0,27$ мкМ при стані номоксії). На відміну від цього, активність адриаміцину в тому ж самому гіпоксичному стані знижувалася. Відсоток PCSC (з $CD24^{+}CD44^{+}ESA^{+}$ біомаркер), активність ALDH та кількість пухлинних сфер у клітинах PANC-1 значно зменшились після лікування 32g. Що ще важливіше, частота ініціювання пухлини зменшилась у 19 разів після лікування 32 г, що краще, ніж у ракіцидину А (зменшення в 4,7 рази). [46]

Чжоу Цзянь здійснював дослідження, що відноситься до технічної галузі промислових мікроорганізмів та галузі біомедицини, зокрема до способу ферментації ракіцидинів мікромоноспорою. Дослідницька група вперше повідомила про поділ ракіцидину А і В від мікробних метаболітів у Китаї та провела попереднє дослідження біологічної активності ракіцидину В (FW523-3). Ізольований штам також продемонстрував значну антибактеріальну активність щодо тестових штамів *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та *Acinetobacter*. Фракції зі значною протипухлинною активністю, отримані з екстракту 20 л ферментаційного бульйону, були структурно висвітлені та виявлені при отриманні сполук, названих ітурином А₆ і актиноміцин-D. Циклічний ліпопептид iturin A₆ демонструє нові протипухлинні дії проти трьох клітинних ліній пухлини, а саме: HeLa, MCF-7, Her G2 зі значеннями IC_{50} $1,73 \pm 0,9$, $6,44 \pm 0,6$ та $8,9 \pm 1,09$ мкг/мл відповідно. Встановлено, що цей пептид неефективний проти пухлинних клітин РД. Встановлено, що другий поліпептид актиноміцин-D активний проти всієї панелі використовуваних клітинних ліній пухлини. Він демонстрував сильніші дії з IC_{50} -значення $<0,9$ мкг / мл проти HeLa та MCF-7, тоді як $11,72 \pm 0,9$ та $1,19 \pm 0,8$ проти Her G2 та клітин RD відповідно. Результати експериментів з оптимізації культури цього штаму показали

більший вихід вторинних метаболітів під час культивування в середовищі глюкоза – дріжджовий екстракт – солодовий екстракт (M2) в умовах культури, встановлених наступним чином, струшування при 95 об / хв, рН 7,8, температура інкубації 28 ° С, протягом 168 год. [47]

Х. Лі разом з вченими виділила штам *Streptomyces sp.* MWW064 був виділений із зразків морських осадов, відібраних у провінції Самут Сакхон, Таїланд. Екстракт виявляв інгібуючу активність щодо інвазії матригелем (відновленим білком позаклітинного матриксу) клітинами пухлини. Фракціонування екстрактів під впливом біологічного дослідження призвело до виділення нової сполуки ракіцидину D (1). Ракіцидин D (1) інгібує інвазію клітин 26-L5 товстої кишки раку миші з IC_{50} 3,3 мкг/мл (= 6,7 мкМ), але не має інгібуючого ефекту росту на ту ж лінію клітин при 10 мкг/мл. Ракіцидини A (2) і B (3), вони походять з *Micromonospora sp.* Ракіцидин B описується як такий, що має ізопропіловий кінець у фрагменті жирної кислоти, але також описується як 3-гідрокси-2,4,16-триметил октадеканова кислота (антеізо-кінець). Тому вчені повторно виділили ракіцидин B і чітко підтвердили, що він має гетеротермінали на основі аналізу ЯМР. З'єднання 2 і 3 демонстрували більш високу цитотоксичність для тієї самої клітинної лінії (IC_{50} = 0,44 мкг/мл та 0,17 мкг/мл), що вказує на те, що алкільний бічний ланцюг жирних кислот відіграє ключову роль у цитотоксичності. Антиінвазивних ефектів 2 і 3 не спостерігалось при нецитотоксичних концентраціях. [48]

Санг-Джип Нам досліджував метастазування пухлини, що є основною причиною смерті онкологічних хворих. Це процес, за допомогою якого пухлинні клітини залишають первинну пухлину, поширюються у віддалені місця через систему кровообігу та встановлюють вторинну пухлину. Було виділено 2, 3, 4 та 5 ракіцидину D (1). Ракіцидини - це 15-членні депсипептиди, що складаються з трьох амінокислот та 3-гідрокси жирних кислот. Наразі повідомлено про три гомологи, ракіцидину A (2) та B (3) від *Micromonospora* та ракіцидин C (4) від *Streptomyces*. Ракіцидини містять рідкісну і незвичну амінокислоту, 4-аміно-2,4-пентадієнову кислоту, яка міститься лише у вторинних метаболітах актиноміцетів. На додаток до

ракіцидинів, на сьогодні повідомляється лише про два типи циклічних пептидів, BE43547 та вінілміцин, що містять цю незвичайну амінокислоту. [49]

Мойтаба Мохсені разом із співавторами досліджували актиноміцети, що виділяють із використанням агарових середовищ крохмалю казеїну та відбирають чотири потенційні штами для оцінки антиоксидантної активності за допомогою стандартних методів DPPH, FRAP та загальної антиоксидантної здатності. Далі, значна антиоксидантна активність штаму, що характеризується морфологічною, фізіологічною, біохімічною та молекулярною характеристиками. За результатами роботи вченими було виділено 20 штамів актиноміцетів, серед них чотири активні ізоляти, позначені як BC 01, BC 02, BC 03 і BC 04, вивчені на антиоксидантну активність. З цих чотирьох ізолятів BC 01 показав потужну антиоксидантну активність у порівнянні з іншими ізолятами. Морфологічний, біохімічна та молекулярна характеристика активного ізоляту BC 01 належить до виду *Streptomyces*. Результати цього дослідження довели, що актиноміцети, виділені з мангрових заростей, є потужним джерелом антиоксидантів. Штам BC 01 виявляв потенційну антиоксидантну активність *in vitro*. Дослідження актиноміцетів з ґрунту мангрових заростей можуть бути корисними при відкритті нових видів для отримання нових препаратів. [50]

Порівняльна характеристика актиноміцентних штамів продуцентів ракіцидину

Табл. 3.1

№	Продуцент:	Джерело вуглецю та нітрогену:	Умови:	Вихід цільового продукту, г/л:	Лінії раку:	Література:
1	<i>Streptomyces</i> sp MWW064	Глюкоза Інозитол	pH=5-9, t=28°C, T=120	5	Гіпоксичні ракові клітини та клітини, схожі на лейкоз	[40]
2	<i>Streptomyces</i> sp MWW064	Глюкоза - 40, Казеїн,	pH=6,6-6,8,	9,3	Карциноми товстої	[41]

		Триптон, Дріжджовий екстракт	t=30°C, T=96		кишки	
3	<i>S. parvulus</i> (NR 041119)	Глюкози - 10, дріжджового екстракту - 4, солодового екстракту - 4	pH=6,7, t=28°C, T=120	5,5	Карцином и печінки	[43]
4	<i>Streptomyces</i> sp GT 61042	Гліцерин-30, казеїновий пептон-2,0, Na ₂ SO ₄ -1,6,	pH=6,7, t=28°C, T=144	0,3	Карцином и клітин легень	[45]
5	<i>Streptomyces</i> sp BE-43547	Гліцерин-30, фітопептон 2,0,	pH=6,7, t=28°C, T=144	4,2	клітинній лінії раку підшлунк ової залози	[46]
6	<i>Streptomyces</i> sp MWW064	Глюкози - 50, дріжджового екстракту - 10, солодового триптон- 2	pH=6,7, t=28°C, T=144	6,4	Карцином а раку легенів	[48]
7	<i>Streptomyces</i> sp MWW064	дріжджовий екстракт: 4 г, солодовий екстракт: 10 г, декстроза KNO ₃ - 2 г	pH=6,7, t=28°C, T=168	6,7	Карцином а раку легенів	[50]

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

4.1 Потреба у цільовому продукті

Метастазування пухлини- це основна причина смерті онкологічно хворих. Це процес, з допомогою якого пухлинні клітини залишають первинну пухлину та поширюються у віддалені місця через систему кровообігу і встановлюють вторинну пухлину. Під час каскаду метастазів злоякісні клітини повинні пройти бар'єр позаклітинного матриксу для того щоб завершити метастазування.[1]

Згідно цього переривання метастазування є перспективним методом при боротьбі з різними видами раку генетичного походження. На даний момент продовжують пошук протинвазійних сполук із вторинних метаболітів мікроорганізмів із культурального відвару штамів актиноміцетів роду *Streptomyces* було виділено та очищено ракіцидин. Ракіцидини - це 15-членні депсипептиди, який складаються з трьох амінокислот та 3-гідрокси жирних кислот. Ракіцидин містить рідкісну та незвичну амінокислоту - 4-аміно-2,4-пентадієнову, що міститься лише у вторинних метаболітах актиноміцетів. Окрім того до ракіцидинів, на сьогодні повідомляється лише про два типи циклічних пептидів, BE43547 і вінілміцин, які містять цю незвичайну амінокислоту. [43]

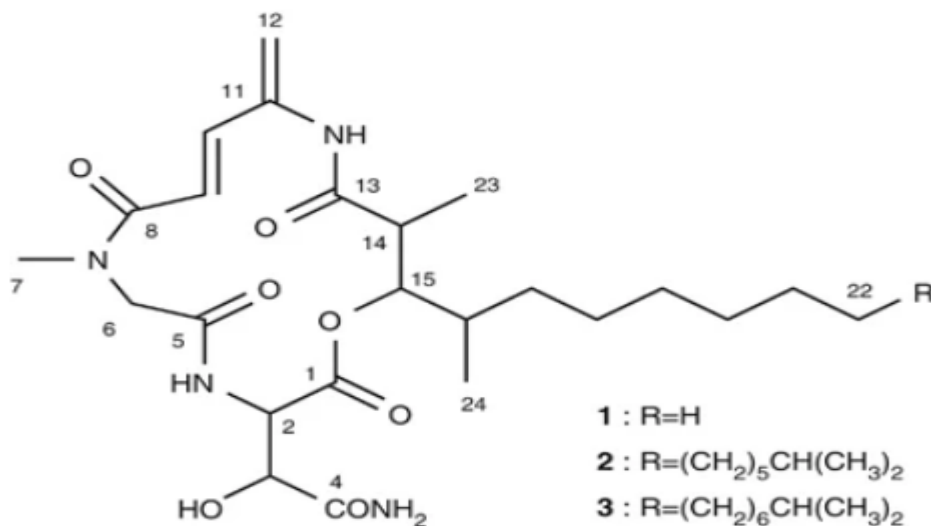


Рис. 1. Структура ракіцидину

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ Літ. Арк. Акрушів 44 177 Кафедра БТМ			
Розроб.	Терещук Л.О.							
Консульт.								
Керівник	Станікова О.В.							
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П							

Поява стійких бактерій збільшило вимоги до виділення нових джерел антимікробних засобів. Актиноміцети, зокрема, *Streptomyces sp.* привернули значну увагу у всьому світі завдяки виробництву багатьох корисних біоактивних метаболітів.

Ракіцидін найбільше використовується при боротьбі із пухлинами.[48].

Щорічно близько 140 тисяч українців діагностують онкозахворювання. Тому пошук нових препаратів при лікуванні раку на даний момент є актуальним[51].

Максимальна доза, що може вміщувати в собі капсула-400 мкг. Щоб визначити скільки потрібно діючої речовини потрібно дотримуватися такої методики:

$$400\text{мкг} - 1 \text{ чол.}$$

$$X - 140\,000$$

$$\text{Тобто } 400 \cdot 140\,000 = 56\,000\,000 \text{ мкг} = 56 \text{ г}$$

Повністю забезпечувати хворих ми не можемо, адже на світовому ринку вже є велика кількість препаратів при боротьбі з раком, а згідно цього ми будемо вводити новий препарат і тому потрібно обрати відсоток тих кого можна буде забезпечувати даною діючою речовиною для початку.

4.2 Розрахунок потужності виробництва

Знаючи те, що в Україні субстанція не виготовлюється то ми можемо визначити річну потужність виробництва для ракіцидину. Тоді потужність виробництва складає:

Отже, ми можемо забезпечити 1% від 100% хворих. [50]

$$140\,000 - 100\%$$

$$X \text{ чол.} - 1 \%$$

$$\text{Тоді } 140\,000 \cdot 1\% / 100\% = 1\,400 \text{ тис. чол.}$$

Схеми лікування раку із застосуванням хіміотерапії відрізняються. Терапія може бути безперервною, а може чергуватися між періодами лікування і спокою для відновлення організму. В основному хіміотерапію призначають регулярними інтервалами, які називаються циклами. Цикл може складатися з одного або кількох препаратів, які необхідно приймати один або кілька днів. Потім кілька днів або

тижнів без лікування, — цей час потрібен для відновлення нормальних клітин від побічних ефектів. Кожні ліки призначаються за схемою, що забезпечує максимальну ефективність препарату з мінімальним побічним впливом на здорові клітини. Якщо використовується більше одного препарату, в графіку лікування буде вказано, як часто і коли який препарат приймати. Отже, згідно схеми обираємо такий тип лікування: 1 тиждень приймаємо по 1 таблетці, 2 тиждень без прийому (дати час клітинам відновитися), 3 тиждень – прийом, четвертий перерва. На початку наступного місяця зробити діагностику. Та визначити подальший прийом ліків. Курс лікування становить 3 місяці. Потрібно розрахувати кількість діючої речовини на 1 курс лікування:

$$400 \text{ мкг} - 1 \text{ таб}$$

$$X - 42 \text{ таб}$$

Отже кількість таблеток на 1 курс лікування 42 таб.

Отже, в 42 таблетках діючої речовини міститься:

$$K_{\text{д.р}} = 400 \cdot 42 = 16800 \text{ мкг}$$

$x = 16800 \text{ мкг} = 16,8 \text{ г ДР}$, далі потрібно розрахувати потужність виробництва:

$$G_{\text{ГП}} = 16,8 \times 1400 = 24 \text{ кг}$$

Таблиця 4.2

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в ракіцидіну

Доза діючої речовини на добу, мкг ракіцидіну	Тривалість прийому, днів	Кількість препарату на 1 людину, мкг ракіцидіну	Загальна кількість хворих	Загальна кількість ракіцидіну на всіх хворих на повний курс, кг
0,0004 (1 таблетка)	42	16 800	14 тис.	24

4.3. Розрахунок потужності виробництва

Так як ми визначили синтезувальну здатність продуцента, то можемо розрахувати кількість культуральної рідини, що необхідно отримати, щоб забезпечити на курс лікування населення України даною діючою речовиною:

При вирощуванні культури *Streptomyces sp.* MWW064 отримуємо концентрацію ракіцидіну, що складає 9,3 г/л

Отже для того щоб отримати 24 кг необхідно:

$$V_{кр} = 24000 / 9,3 = 2581 \text{ л культуральної рідини}$$

Тоді враховуючи втрати під час виділення (80%) так як нам потрібна високоочищена активна субстанція для фармацевтичного застосування з метою лікування онкологічних захворювань:

$$V_{кр} = \frac{2581}{1 - 0,8} = 12\,905 \text{ л}$$

4.4. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Розрахуємо, яку ж кількість культуральної рідини ми отримуємо під час циклу ферментації для того, щоб розрахувати відповідну кількість стадій приготування посівного матеріалу.

1. Приймаємо кількість робочих днів $T_{рд} = 54$, тоді розрахуємо кількість продукту на добу:

$$V_{д} = V_{гп} / T_{гп} = 12\,905 \text{ л} / 260 \text{ днів} = 50 \text{ л /добу.}$$

2. Кількість продукту за один цикл ($V_{кр}$) становить:

$$V_{цк} = (K1 \cdot V_{д} \cdot T_{цф}) / 24 = (1,1 \cdot 50 \cdot 104) / 24 = 240 \text{ л,}$$

де $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K1 = 1,1$);

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, що включає в себе тривалість виробничого біосинтезу (96 год) і час підготовки ферментера до роботи (8 год).

Тепер необхідно розрахувати об'єм поживного середовища і посівного матеріалу для виробничого біосинтезу. Розраховуємо об'єм посівного матеріалу для виробничого біосинтезу:

$$V_{п.м.1} = 240 \cdot 0,1 = 24 \text{ л}$$

Наступний етап це розрахунок об'єму поживного середовища:

$$V_{п.с.1} = 240 - 24 = 216 \text{ л}$$

Згідно отриманих даних маючи об'єм $KP = 240$ л обираємо ферментер із коефіцієнтом заповнення 0,6, тоді:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб}} / K_{\text{зап}} = 240/0,6=400 \text{ л (Геометричний об'єм ферментера)}$$

Далі обираємо найближчий ферментер із геометричним об'ємом - 0,4 м³

Наступною дією є розрахунок об'єму поживного середовища та посівного матеріалу для ферментації в інокуляторі. Розраховуємо об'єм посівного матеріалу для виробничого біосинтезу:

$$V_{\text{п. м}} = 24 \times 0,1 = 2,4 \text{ л}$$

Потім розраховуємо об'єм поживного середовища:

$$V_{\text{п.с.}} = 24 - 2,4 = 21,6 \text{ л}$$

Отже, маючи об'єм КР=24 л обираємо ферментер із коефіцієнтом заповнення 0,6, тоді:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб}} / K_{\text{зап}} = 24/0,6=40 \text{ л (Геометричний об'єм інокулятора)}$$

Згідно даних обираємо найближчий інокулятор із геометричним об'ємом - 40 л 2,4- що є об'ємом посівного матеріалу, який ми можемо тримати під час культивування культивуванні в колбах на качалці

Для цього використовуємо качалочні колби з об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл і коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 2400 / (750 \times 0,2) = 16 \text{ качалочних колб.}$$

Таким чином, для отримання посівного матеріалу необхідно 16 качалочних колб. Отже, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ракіцидіну в ферментері об'ємом 0,4 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 2 етапи. Приймаємо для встановлення один посівний апарат з об'ємом 40 л та колби на качалці.

Узагальнення вибору обладнання

Таблиця 4.4

Геометричний об'єм ферментера, V_{ϕ}	Коефіцієнт заповнення, (КР)	Робочий об'єм, $V_{\text{роб}}$	Кількість поживного середовища	Кількість посівного матеріалу
400	0,6	240	216	24
40	0,6	24	21,6	2,4
КОЛБИ				

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

БІОСИНТЕЗУ РАКІЦИДИНУ

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування

Для біосинтезу ракіцидину часто використовуються генно-інженерні штами *Streptomyces sp.* MWW064, оскільки вони дозволяють отримати досить високий вихід цільового продукту із високим ступенем очищення.

На сьогодні, основним джерелом отримання ракіцидину є культивування за допомогою різних штамів *Streptomyces sp.* [2]. Окрім того є ще велика кількість різних мікроорганізмів, за допомогою яких можливе отримання ракіцидину, зокрема – *Micromonospora sp.* Для того щоб збільшити виход препарату доцільно використовувати середовища, що містить такий склад: 5 г глюкози, 10 г кукурудзяного крохмалю, $0,5 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 г K_2HPO_4 , 2 г дріжджовий екстракт, 5 г триптон, 3 г CaCO_3 , 3г казеїну та вода. Під час процесу культивування аерацію ведуть таким чином, щоб швидкість розчинення кисню становила 2,4-3,8 г O_2 /л, а культивування продуцента здійснювалося при значенні рН, що дорівнює 6,6-6,8 Час культивування становить – 96 год, $t = 30^\circ\text{C}$, концентрація препарату – 9,3 г / л. [6]

Вміст вуглекислого газу під час процесу культивування повинна бути в межах 0,7-0,9% та водночас регулюють шляхом подачі повітря в кількості 250 об/хв. Високопродуктивний мутантний штам *Streptomyces sp.*. Отриманий штам володіє більш високим рівнем накопичення ракіцидину. Вирощування посівного матеріалу штаму *Streptomyces sp.* MWW064 здійснюють на середовищ, що представлено вище. Як продуцента використовують мутантний штам *Streptomyces sp.* MWW064. [2]

У табл. 5.1 представлено порівняльну характеристику особливостей одержання ракіцидину з використанням різних актиноміцетів.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ РАКІЦИДИНУ	Літ.		Арк.	Акрушів
Розроб.	Терешук Д.О.								
Консульт.								48	177
Керівник	Станікова О.В.					ло			
Н. Контр.						Кафедра БТМ			
Зав. каф.	Стабніков В.П								

Порівняльна таблиця продуцентів

Таблиця 5.1

Продуцент :	Склад поживного середовища	Умови культивування:	Концентрація цільового продукту, г/л:	Література
<i>Streptomyces</i> sp. MWW064	• 5 г глюкози, • 10 г кукурудзяного крохмалю, • 3 г казеїну • 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • 1 г K_2HPO_4, • 2 г дріжджовий екстракт • 5 г триптон • 3 г CaCO_3	• pH 6,6-6,8 • T=96 год • t=30 °C	9,3	Igarashi Y, Shimasaki R, Miyanaga S. et al. Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived <i>Streptomyces</i> sp. J Antibiot (Tokyo) 2010 року; 63: 9: 563-565. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20588298/
<i>Micromonospora</i> sp. FIM-R150103	• 4 г фітопептону, • 30 г глюкози, • 0,5 г MgSO_4, • 5 г NaCl, • 5 г CO_3	• pH 7,5 • T=120 год • t=30 °C	5	CN201711187508/ Zhou Jian; Lin Feng; Jiang Hong; Lian Yunyang; Jiang Honglei; Chen Li; Zhao Wei; Fang Zhikai. Marine micromonospora strain for fermenting Rakicidin B1 and application thereof. No. 25, Chengzhan Road, Cangshan District, Fuzhou City, Fujian 350007 2019-02-15 https://www.jmrhip.

				com/static/patent/html/CN108300672B.html
<i>Micromonospora sp.</i> FIM02523	• 40 г розчинний крохмаль • 10 г сахароза, • 10 г соєвий пептон • 20 г дріжджовий порошок, • 1г гліцин, • 5 г NaCl, • 0,5 г MgSO₄, • 5 г CaCO₃	• pH 6 • T=55 год • t=30 °C	3,5	Wang Ke Xing, Chen Ruwen, Tian Xinpeng. Study of the progress of obligate marine actinomycetes Salinasporium. Biological Resources. 2018, 40 (5): 430-442. doi:10.14188/j.ajsh.2018.05.007.

На даний час найбільш використовуються такі штами: *Streptomyces sp.* MWW064 [2], *Micromonospora sp.* FIM-R150103 [9] та *Micromonospora sp.* FIM02523 [10].

Саме за допомогою представлених мікроорганізмів можна отримати найбільшу продуктивність препарату. В таблиці 2.1 наведено приклади середовищ для культивування мікроорганізмів. Крім того для *Micromonospora sp.* FIM02523 та *Micromonospora sp.* FIM-R150103 потрібно більше часу щоб накопичити ракіцидін, а для *Streptomyces sp.* MWW064 з оптимальним середовищем накопичує найбільшу кількість ракіцидину. На прикладі таблиці можемо порівняти, за допомогою якого мікроорганізму буде відбуватися найбільше виробництво препарату.

Розрахунок складу поживного середовища

Посівний матеріал вирощують в колбах з ємністю 250 мл, що містять 100 мл середовища на качалці, що робить 250 об/хв протягом 20-24 год при 30°C. Інокулят передають в ферментаційне середовище.

Склад середовища, г/л:

- 5 г глюкози,
- 10 г кукурудзяного крохмалю,
- 3 г казеїн
- 0,5 MgSO₄ · 7H₂O
- 1г K₂HPO₄,

- 2г дріжджовий екстракт
- 5 г триптон
- 3 г CaCO_3

Умови культивування становлять: рН 6,6-6,8 процес ферментації проводять методом глибинного культивування при температурі 30 °С, Т = 96 год. Вихід ракіцидіну після ферментації становить 9,3 г/л. [2]

**Склад та вартість поживного середовища для культивування
мікроорганізмів, які входять до препарату ракіцидін**

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i> MWW064	Глюкоза - 5	25	0,125	1
	триптон - 5	4168	20,8	2
	дріжджовий екстракт 2	936	1,9	3
	кукурудзяний крохмал -10	35	0,35	4
	Казеїн-3	400	1,2	10
	CaCO_3 - 3;	2	0.006	5
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5	7,30	0,004	6
	K_2HPO_4 - 1	19,50	0,02	7
	Вартість 1 л середовища – 24.4			
<i>Micromonospora</i> <i>sp.</i> FIM- R150103	Глюкози-30	25	0,75	1
	Фітопептон-4	8320	33,3	8
	MgSO_4 -0,5 г	7,30	0,004	6
	NaCl - 5 г	3,8	0,019	12
	CaCO_3 -5 г	2	0,006	5
	Вартість 1 л середовища – 34,1			
<i>Micromonospora</i> <i>sp.</i> FIM02523	розчинний крохмаль-40 г	25	1	1
	Сахароза-10 г,	18	0,18	3
	соевий пептон-10 г	8100	81	13
	дріжджовий порошок-20 г	2	0,04	9
	Гліцин- 1г	310	0,31	11

	NaCl-5 г	3,8	0,019	12
	CaCO ₃ -5 г	2	0,006	5
	MgSO ₄ - 0,5 г	7,30	0,004	6
	Вартість 1 л середовища – 82,6			

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2021 р.:

1. <https://prom.ua/p733001156-glyukoza-kristallicheskaya.html?>
2. <https://prom.ua/p1310539109-pepton-tripton-dmikrobiologii.html?>
3. <https://prom.ua/ua/p1151929421-ekstrakt-kormovyyh-drozhzhej.html>
4. <https://prom.ua/p885596924-kukuruznyj-krahmal.html?>
5. <https://prom.ua/p799115469-mel-kormovoj-krejda.html?&primelead=MS41>
6. <https://prom.ua/p518590942-sulfat-magniya-odnovodnyj.html?&primelead=MC41>
7. <https://prom.ua/p2896870-nitrat-natriya-natrij.html>
8. <https://shop.neofroxx.com/Phyto-Peptide-Bromide-Agar-Base-oxid.html>
9. <https://prom.ua/p913101722-pshenichno-solodovij-ekstrakt.html?>
10. <https://prom.ua/p63870885-kazein-pischevoj.html?>
11. <https://prom.ua/p626969032-aminokislota-glitsin-farm.html?>
12. <https://prom.ua/p535889076-sol-ekstra-mozyr.html?&primelead=MS42Ng>
13. <https://prom.ua/p583022136-izolyat-soevyj-protein.html?&primelead=MS4xNg>

Умовна вартість 1 мг цільового продукту ракіцидину при культивуванні таких штамів *Streptomyces sp.* MWW064, *Micromonospora sp.* FIM-R150103 та *Micromonospora sp.* FIM-R150103

Таблиця 5.3

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ракіцидину мг/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту. грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за год
<i>Streptomyces sp.</i> MWW064	24,4	9,3	2,6	96	0,09
<i>Micromonospora sp.</i> FIM-R150103	34,1	5	6,8	120	0,07
<i>Micromonospora sp.</i> FIM02523	82,6	3,5	23,6	55	0,10

Отже, отримавши дані ми можемо зробити висновок про те, що *Streptomyces sp.* MWW064 порівняно із *Micromonospora sp.* FIM-R150103, і *Micromonospora sp.* FIM02523 характеризується найбільшим виходом цільового продукту – 9,3 г/л. Крім того, швидкість росту найбільш оптимальна для отримання даної кількості продукту і вартість поживного середовища значно нижча за інші середовища, вихід препарату є найбільшим в порівнянні, тому *Streptomyces sp.* MWW064 є найкращим продуцентом ракіцидіну.

2.2. Обґрунтування вибору способу культивування та типу ферментера

Оптимальна температура для культивування *Streptomyces sp.* MWW064 становить 30°C, рН, від час якого проводиться культивування становить 6,6 [2]. Ці дані свідчать про те, що є ризик контамінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Тому потрібно забезпечити асептичні умови біосинтезу шляхом повної стерилізації обладнання, аераційного повітря, поживного середовища, який подається в ферментер.

Культивування *Streptomyces sp.* MWW064 здійснюють глибинним методом, так як при поверхневому культивування проблематично забезпечити асептичні умови культивування.

Біосинтез ракіцидіну здійснюється безперервним способом, тому що при цьому відбувається найбільший вихід діючої речовини.

З точки зору конструктивних особливостей ферментери розрізняються способами підведення енергії і аерації середовища [6]:

- 1) ферментери із підведенням енергії до рідкої фази;
- 2) ферментери із підведенням енергії до газової фази;
- 3) ферментери із комбінованим підведенням енергії.

У ферментерах із підведенням енергії до газової фази аерація та перемішування субстрату відбувається за допомогою стисненого повітря.

До ферментерів із підведенням енергії до рідкої фази відносяться апарати, що складаються із циліндричного дифузора та мішалки із порожніми лопатями та валом. При обертанні мішалки створюється розрідження, що призводить до підйому рідини у кільцевому зазорі між дифузоров та стінками апарату з подальшим її поверненням до дифузору.

Ферментер із комбінованим підведенням енергії – це циліндричний апарат, усередині якого розташована механічна мішалка та барботер. У апаратах цього типу підведення енергії до газової фази здійснюється для аерації, а до рідкої фази - для перемішування.

Так як для біосинтезу ракіцидіну необхідна досить висока інтенсивність перемішування, тоді найдоцільніше буде обрати ферментер із комбінованим підведенням енергії, який обладнаний механічною мішалкою і барботером.

Біосинтез ракіцидіну посилюється при швидкості перемішування 500-1000 об/хв [2]. Таку швидкість перемішування можна досягти, використовуючи швидкісні турбінні мішалки [6].

При виборі типу ферментеру необхідно врахувати те, що *Streptomyces* аероб, тому обов'язковою вимогою для культивування є безперервна аерація поживного середовища. Аерація культуральної рідини забезпечується шляхом подачі стерильного стисненого повітря через барботер. Механічне перемішування та безперервна аерація створюють сприятливі умови для доступу поживних речовин та кисню до клітин продуцента [7].

Отже, біосинтез ракіцидіну здійснюють у аеробних умовах. Для культивування *Streptomyces sp.* MWW064 найдоцільніше використовувати ферментер який обладнаний барботером та мішалкою.

2.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Для початкового розмноження культури у колбах використовують середовище наступного складу (г/л) [2]:

2.3.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Для отримання посівного матеріалу у колбах на качалках потрібно 2,4 л середовища. Перед культивуванням колби засівають клітинами, розмноженими на середовищі наступного складу, г/л:

- 5 г глюкози,
- 10 г кукурудзяного крохмалю
- 3 г казеїн
- 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1г K_2HPO_4 ,
- 2г дріжджовий екстракт
- 5 г триптон
- 3 г CaCO_3

з розрахунку 2 мл посівного матеріалу на 50 мл середовища. Отже, для засіву 2,4 л середовища необхідно:

2 мл – 50 мл

$$x - 2400 \text{ мл}$$

$$x = 2 \times 2400 / 50 = 96 \text{ мл}$$

Згідно отриманих даних, потрібно приготувати 96 мл поживного середовища. Зважаючи на невеликий об'єм його стерилізація буде відбуватися у автоклаві.

Режим стерилізації компонентів поживних середовищ визначається за допомогою температури їх розкладання.

Проаналізувавши отриманий склад поживного середовища, ділимо його на композиції в залежності від режиму його стерилізації:

- **Композиція А:** Кукурудзяний крохмал, казеїн, дріжджовий екстракт, триптон, глюкоза - режим стерилізації 112°C, 0,05 МПа, 30 хв.

(Спочатку заварюємо крохмаль та заварюємо до 60°C та одночасно інтенсивно перемішуємо. Після заварювання робимо стерилізацію всього складу даного середовища)

- **Композиція Б:** $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та K_2HPO_4 - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв

Композицію Б для кращої стерилізації вимагає більш високих температур і при взаємодії вони не впадають в осад.

- **Композиція В:** CaCO_3 (131 °C, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Крейда потрібно стерилізувати окремо та вимагає високої температури. Суспендуєть у воді для кращого розчинення .

2.3.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Під час другого етапу необхідно одержати 24 л поживного середовища. Для цього використовують інокулятор з об'ємом 40 л.

- **Композиція А:** Кукурудзяний крохмал, казеїн, дріжджовий екстракт, триптон, глюкоза - режим стерилізації 112°C, 0,05 МПа, 30 хв.

(Спочатку заварюємо крохмаль, до сорочки ферментера подається гаряча вода та заварюємо до температури 60°C та інтенсивно перемішуємо. Після заварювання робимо повну стерилізацію всього складу даного середовища)

- **Композиція Б:** $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та K_2HPO_4 - режим стерилізації 131°C, 0,15 МПа, 40 хв

Композицію Б для кращої стерилізації вимагає більш високих температур та при взаємодії вони не випадає в осад.

- **Композиція В:** CaCO_3 (131°C , режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Крейда стерилізується окремо та вимагає більш високої температури. Суспендується у воді для найкращого розчинення .

2.3.4 Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

Під час даного етапу необхідно приготувати 240 л поживного середовища

Проаналізувавши склад поживного середовища, потрібно поділити його на композиції від режиму стерилізації

- **Композиція А:** Кукурудзяний крохмал, казеїн, дріжджовий екстракт, триптон, глюкоза - режим стерилізації 112°C , 0,05 МПа, 30 хв.

(Спочатку заварюємо крохмаль, в сорочку ферментера подається гаряча вода та заварюємо до температури 70°C та інтенсивно перемішуємо протягом 15 хв, потім даємо охолонути отриманій суміші. Після даного етапу додаємо всі отримані компоненти та стерилізуємо)

- **Композиція Б:** $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та K_2HPO_4 - режим стерилізації 131°C , 0,15 МПа, 40 хв

Композицію Б для повної стерилізації вимагає високих температур та при їх взаємодії вони не випадають в осад.

- **Композиція В:** CaCO_3 (131°C , режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Крейда стерилізується окремо так як вимагає високої температури. Суспендується у воді для більш кращого розчинення .

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена у *табл. 6.1*.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ракіцидіна

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник серії OBR 200 M-2K, виробник Bahçivan (Туреччина), продуктивність становить 1800 м ³ /год. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень [2].
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр серії QF 0050, виробник ОМІ (Італія), ступінь очистки E=95%, продуктивність становить 5000 л/хв., фільтруючий матеріал - кераміка. [3].
К-3	Компресор	1	Компресор TURBO AIR-2020 фірми CAMERON (США), потужність якого 30-55 м ³ /хв [4].
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач для стисненого повітря серії RA 50RA, виробник ОМІ (Іспанія), продуктивність становить 5000 л/хв. [5].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер серії Р 500.600 фірми «Компрессормаш-Сервис» (Україна), об'єм 500 л, робочий тиск становить 10 бар [6].
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії WALCOM TD 1 (Італія), максимальний робочий тиск якого 12 атм [7].
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр серії PF 0050 1, виробник ОМІ (Італія), ступінь очистки становить E=99%, продуктивність 5000 л/хв., фільтруючий матеріал це акрилове волокно[8].

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Терешук Д.О.				РОЗДІЛ 3. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							58	177
Керівник	Станікова О.В.					59		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стабніков В.П							

1	2	3	4
Д-8, Д-11, Д-14, Д-17, Д-20	Об'ємно-ваговий дозатор	6	Дозатор виробництва НВП "Техноаги". Точність зважування 0,1% [1].
Н-10, Н-13, Н-16, Н-19, Н-22,	Насос відцентровий	6	Відцентровий насос фірми EBARA (Японія) серії Ebara 2CDX 200-30, продуктивністю 12,6 м ³ /год [9].
Р-9	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 10 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)[10].
Р-12	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 30 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
Р-15	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 100 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].
Р-18	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 300 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна).[10].
Р-21	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 5 л, оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна). [10].

1	2	3	4
Ф-23, Ф-24, Ф-26 Ф-27	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр тонкої очистки серії HF 0050 1, виробник ОМІ (Італія), ступінь очистки становить $E=99,99\%$, продуктивність якого 5000 л/хв., фільтруючий матеріал це боросилікатне волокно [11].
I-28	Інокулятор	1	Ферментер фірми АгроМаш (Росія), об'ємом 40 л, виготовлений із нержавіючої сталі, обладнаний сорочкою, мішалкою, пробовідбірником, датчиками температури та рН [12].
H-29	Насос перистальтичний	1	Перистальтичні насоси високого тиску серії FPSH є промисловим насосом, який розрахований на цілодобову роботу. Продуктивність становить 150 м ³ /год і тиск до 15 бар. Цей тип насоса може працювати у режимі «сухого ходу», відсутні ущільнення, є реверсивним, самовсмоктувальним. [10]
Фр-30	Ферментер	1	Ферментер фірми АгроМаш (Росія), з об'ємом 0,4 м ³ , виготовлений із нержавіючої сталі, обладнаний сорочкою, мішалкою, пробовідбірником, датчиками рН та температури [12].

*Примітка: підбір обладнання здійснювався за допомогою наступних інтернет-ресурсів:

1. Дозатори Техноваги. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.technowagy.com.ua/uk/products/31>
2. Вентилятор центробежный [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p874366446-ventilyator-tsentrobeznyj-obr.html>
3. Фильтр очистки воздуха [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://equinet.com.ua/ru/bloki-podgotovki-vozdukh-filtry/3270-ms104-s-25-blok-podgotovki-vozdukh-samozzi-italiya.html>
4. Центробежный компрессор TURBO AIR-2020 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.promtula.ru/catalog/item/6710.htm>
5. Охладители сжатого воздуха ОМІ [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p35460814-ohladiteli-szhatogo-vozduha.html>
6. Восдухосборник (ресивер) Р 500.600 (500 л) [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://kompressormash.com/p/142221790-vosduhosbornik-resiver-r-500-600-500-l/>
7. Wacom 60152 Нагреватель сжатого воздуха TD1 PRO [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://artcompas.ru/podgotovka-vozdukh/sistema-podgotovki-vozdukh-wacom-filtr-gruppa-td-1-pro/>
8. Фильтр сжатого воздуха второй ступени [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p998238498-0050-filtr-szhatogo.html>
9. Центробежный насос [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://filter-ua.com.ua/centrobezhnye-promishlennye-nasosi/centrobezhnyj-nasos-ebara-2sdh-200-30/>

10. Реактор фармацевтический, химический, пищевой. GMP [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://stprom.com.ua/p16779567-reaktor-farmatsevticheskij-himicheskij.html>
11. Фильтр тонкой очистки сжатого воздуха [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://prom.ua/p997502990-0050-filtr-tonkoj.html>
12. Ферментеры [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.agro-mash.ru/fermenter.html>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищого приміщення за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1).

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

Повітря очищується від грубого аерозолю на фільтрі грубої очистки (Ф-2).
Ступінь очищення – 95 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Повітря необхідно стиснути для забезпечення умов нормальної аерації.

Повітря стискають у компресорі до 0,4 МПа. Стиснення повітря в компресорі (К-3) призводить до підвищення його температури до 120–150 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря «переохолоджують» в теплообміннику-охолоджувачі повітря (Т-4) до температури 20 °С. Далі повітря подають на ресивер (Р-5) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи. Після цього ступінь вологості складає 60 %.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря підігрівують до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику-нагрівачі (Т-6).

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-7). Ступінь очищення – 99 %.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром (Ф-45, Ф-47, Ф-49) для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,99 %.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Терещук Д.О.							
Консульт.									
Керівник		Станікова О.В.							
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П							
					Літ.				Арк.
									62
									177
					РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ				
					Кафедра БТМ				
					63				

ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Для вирощування інокуляту у колбах на качалці необхідно приготувати 2,4 л поживного середовища, складу:

- глюкози
- кукурудзяного крохмалю,
- дріжджовий екстракт
- триптон
- казеїн
- K_2HPO_3
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $CaCO_3$

Вміст компонентів для приготування 2,4 л поживного середовища наведено в табл. 4.4.

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,4 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 2,4 л, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
глюкози	5	12	А	500
кукурудзяного крохмалю,	10	24		
дріжджовий екстракт	2	4,8		
казеїн	3	7,2		
триптон	5	12		
Вода		440		
K_2HPO_3	1	2,4	Б	1870
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	1,2		
Вода		1866		
$CaCO_3$	3	7,2	В	
Вода		23		30
Всього		2400		2400

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 24 г кукурудзяного крохмалю та в 4 рази більше води (100) та заварюють при 70°C, потім дають суміші охолонути. Далі на технічних вагах зважують 4,8 г дріжджового екстракту, 12 г глюкози, 12 триптона, 7,2 г казеїну та. Наважки переносять у колбу (включаючи борошно) об'ємом 1 л, додають 440 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.5.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2,4 г K_2HPO_3 , 1,2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Наважки переносять у колбу об'ємом 3,5 л, додають 1866 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.5.

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 7,2 г $CaCO_3$. Наважки переносять у колбу об'ємом 100 мл, додають 23 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Готова композиція направляється до ТП 4.5.

ДР 2.2. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л.

Для одержання інокуляту на другому етапі необхідно приготувати 24 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 24 л поживного середовища наведено в табл. 4.5.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 24 л поживного
середовища**

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 24 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкози	5	120	А	5
кукурудзяного крохмалю,	10	240		
дріжджовий екстракт	2	48		
казеїн	3	72		
триптон	5	120		
Вода		4400		
K_2HPO_3	1	24	Б	18,7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	12		
Вода		18660		
$CaCO_3$	3	72	В	
Вода		230		0.3
Всього	24			24

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) у реактор-змішувач (Р-9) об'ємом 10 л подають 240 г кукурудзяного крохмалю та подаємо 1 л води, далі в сорочку подаємо гарячу воду, включаємо мішалку та при інтенсивному перемішуванні здійснюємо заварювання при 70°C. Після заварювання та охолодження суміші в реактор-змішувач додаємо 120 г глюкози, 48 г дріжджового екстракту, 120 г тритона, та 72 г казеїну, додають 4 л питної води та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв. Після стерилізації композиція А насосом (Н-10) подається в інокулятор (ІН-28) об'ємом 40 л (до ТП 3.5).

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) у реактор-змішувач (Р-12) об'ємом 30 л подають 24 г K_2HPO_3 , 12 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, додають 18,7 л питної води та

вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Після стерилізації композиція Б за допомогою насоса (Н-13) подається в інокулятор (ІН-28) об'ємом 40 л (до ТП 3.5).

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 72 г CaCO_3 . Наважки переносять у колбу об'ємом 750 мл, додають 230 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

Готова композиція направляється до ТП 3.5.

ДР 2.3. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,4 м³.

Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в табл. 4.7.

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 240 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 240 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкози	5	1,2	А	50
кукурудзяного крохмалю,	10	2,4		
дріжджовий екстракт	2	480		
казеїн	3	720		
триптон	5	1,2		
Вода		44		
K_2HPO_3	1	240	Б	187
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	120		
Вода		186		
CaCO_3	3	720	В	
Вода		2,3		3
Всього	240			240

ДР 2.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-14) у реактор-змішувач (Р-15) об'ємом 100 л подають 2,4 кг кукурудзяного крохмалю та додають 10 л води, в сорочку подають гарячу воду, вмикають мішалку та відбувається заварювання крохмалю, після його охолодження додають 480 г дріжджового екстракту, 1,2 кг глюкози, 1,2 кг тритона та 720 г казеїну, додають 40 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою – 5л), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв. Після стерилізації композиція А насосом (Н-16) подається в ферментер (Фр-29) об'ємом 0,4 м³ (до ТП 4.1).

ДР 2.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-17) у реактор-змішувач (Р-18) об'ємом 300 л подають 1,4 кг NaNO₃, 1,5 кг MgSO₄ · 7H₂O, додають 15 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою – 18,7), та вмикають мішалку. Після розчинення середовище стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

. Після стерилізації композиція Б за допомогою насосу (Н-19) подається в ферментер (Фр-29) об'ємом 0,4 м³ (до ТП 4.1).

ДР 2.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-20) у реактор-змішувач (Р-21) об'ємом 5 л подають 240 г CaCO₃, додають 2,3 л питної води (зважаючи на 10% конденсату, що утворюється при стерилізації гострою парою – 300 мл), та вмикають мішалку. Після розчинення композиція В за допомогою насосу (Н-22) подається в ферментер (Фр-29) об'ємом 0,4 м³, у якому композиція В стерилізується гострою парою при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 40 хв.

. Після стерилізації композиція В за допомогою насосу (Н-22) подається в ферментер (Фр-29) об'ємом 0,4 м³ (до ТП 4.1).

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури Streptomyces sp. MWW064

Колекційна культура *Streptomyces sp. MWW064* зберігається у пробірках з середовищем Лурія-Бертані (ЛБ) за температури 4°C. Пересіви здійснюють кожні 3-

4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури Streptomyces sp. MWW064 на агаризованому середовищі

Колекційну культуру *Streptomyces sp. MWW064*, що зберігалася в пробірках з середовищем ЛБ (від ТП 3.1), розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з середовищем МПА і вирощують при температурі 37 °С протягом 24 год.

ТП 3.3. Вирощування робочої культури Streptomyces sp. MWW064 на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА та вирощують при температурі 37 °С протягом 24 год.

ТП 3.4. Розмноження клітин Streptomyces sp. MWW064 в колбі

У пробірку з робочою культурою *Streptomyces sp. MWW064* (від ТП 3.3), вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колбу з розлитим поживним середовищем.

Культивування *Streptomyces sp. MWW064* здійснюють в колбі на качалці впродовж 2-6 годин при температурі 30⁰С, швидкість перемішування 200 об/хв.

Після вирощування інокуляту відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

У колбу об'ємом 5 л в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 1.2.1), додають композицію Б (від ДР 1.2.2), композицію В (від ДР 1.2.3), перемішують та розливають по 150 мл у 16 качалочних колб об'ємом 750 мл.

У кожену колбу в асептичних умовах вносять по 6 мл інокуляту (від ТП 3.4).

Культивування *Streptomyces sp. MWW064* здійснюють в колбах на качалці впродовж 12 годин при температурі 30⁰С, швидкості обертів 200 об/хв.

Після вирощування інокуляту, посівний матеріал зливають в одну колбу об'ємом 5 л і відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 3.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л

В асептичних умовах в інокулятора (ІН-26) об'ємом 40 л подають у стерильних умовах композицією В з колби 750 мл (від ДР 2.2.3), подають композицію А (від ДР

2.2.1) з реактора об'ємом 10 л (Р-9), подають за допомогою насосу (Н-12) композицію Б з реактора об'ємом 30 л (Р-15) (від ДР 2.2.2) та подають через засівну колбу посівний матеріал (від ТП 3.5).

Вмикають мішалку, у інокулятор подають аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Фр-23) (від ДР 1.7), температура 30⁰С, швидкість перемішування 200 об/хв., тривалість культивування 96 год. Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води.

Кожні 6 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування

У ферментер (Фр-28) об'ємом 0,4 м³ подають у стерильних умовах композицією В з реактора 5 л (від ДР 2.3.3) за допомогою насосу (Н-22) подають композицію А (від ДР 2.3.1) з реактора об'ємом 100 л (Р-15), подають за допомогою насосу (Н-19) композицію Б з реактора об'ємом 300 л (Р-33) (від ДР 2.3.2) після цього перекачують посівний матеріал з інокулятора (ІН-26) об'ємом 400 л (від ТП 3.6) по трубі перетискування стерильним стисненим повітрям у ферментер (Фр-29).

Вмикають мішалку, у ферментер подають аераційне повітря через індивідуальний фільтр (Ф-27) (від ДР 1.7), культивують при температурі 30⁰С. Температуру підтримують поданням у сорочку пари та холодної води.

У процесі культивування швидкість перемішування підтримують на рівні 500-1000 об/хв. Швидкість подачі аераційного повітря - 2 л/хв. Рівень розчинного кисню підтримується на рівні 40%.

Культивування здійснюють протягом 96 год.

Кожні 6 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси та ракіцидін. Максимальна концентрація біомаси спостерігається на 42 годину культивування та складає 4,7 г/л. В кінці процесу культивування концентрація ракіцидину – 9,3 г/л.

ЗВ 5. Знешкодження відходів

ЗВ 5.1 Знешкодження рідких відходів

Стічні води можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води спочатку стерилізують і нейтралізують. Потім їх спрямовують на очисні споруди, де здійснюють механічне очищення. Ступінь очищення стічних вод становить 50-70%.

ЗВ 5.2 Знешкодження газоподібних відходів

Очищення газоподібних відходів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодження відпрацьованого повітря та зниженням вологості у вологовідбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення відпрацьованого повітря використовують фільтри з волокнистих матеріалів.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РАКІЦИДІНУ

Упродовж процесу культивування періодично (кожні 6 год) здійснюють проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю, визначення концентрації ракіцидіну та біомаси, а також вмісту джерела вуглецю та амонійний азот.

Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється за допомогою мікроскопіювання та розсівом на чашки Петрі із агаризованими середовищами.

Проби культуральної рідини відбирають в дотриманні стерильних умов із колб за допомогою стерильної піпетки та із інокуляторів та ферментера за допомогою пробовідбірника.

Мікроскопіювання

Рід *Streptomyces* включає грампозитивні нитчасті бактерії, є аеробами, які можуть продукувати добре розвинені вегетативні гіфи (діаметром яких становить від 0,5 до 2,0 мкм) із гілками. Хоча повітряні гіфи та міцелії, які виникають із них, є рухливими, рухливість досягається за допомогою розпорошення спор. Споріві поверхні можуть бути грубими, гладкими, волохатими, бородавчастими або колючими. В деяких видів повітряні гіфи можуть складаються із довгих прямих ниток, що несуть 50 та більше. Деякі штами можуть утворювати на субстратних гіфах короткі ланцюжки зі спор. Під час мікроскопіювання не повинно спостерігатися сторонньої мікробіоти.

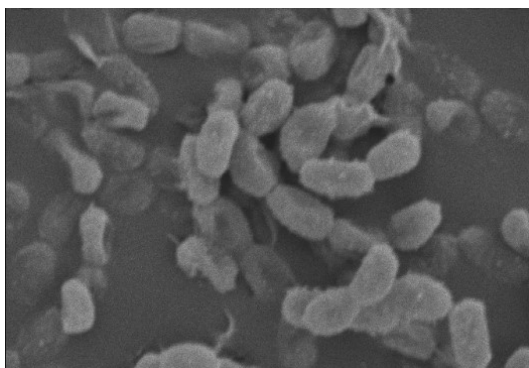


Рис 8.1. Клітини *Streptomyces* sp. під мікроскопом

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РАКІЦИДІНУ		
Розроб.	Терещук Д.О.						
Консульт.							
Керівник	Станікова О.В.						
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Акрюшів
						72	177

Висів на агаризовані середовища

Культуральну рідину розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів і інкубують при температурі 37 та 30 °С відповідно.

Через 24 години росту на МПА при 37 °С *Streptomyces* утворює білуваті напівпрозорі колонії діаметром 1,5-2,5 мм; поверхня колоній гладка, краї рівні, структура однорідна, консистенція пастоподібна (рис 5.2). Відсутність колоній сторонніх бактерій свідчить про чистоту культури.



Рис. 8.2. Колонії Streptomyces sp.

Також проводять мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища. Для цього в асептичних умовах відбирають пробу. Далі наливають по кілька крапель у чашки Петрі з СА та МПА і ставлять у термостати на 30°C та 37°C відповідно. Відсутність колоній сторонніх мікроорганізмів свідчить про чистоту культури.

Показники росту і синтезу цільового продукту

Визначення біомаси ваговим методом

Метод широко застосовують у виробничих та дослідних лабораторіях для непрямого визначення кількості мікроорганізмів у вигляді сухої чи сирої біомаси. Кількість біомаси зазвичай виражають в грамах чи міліграмах на літр середовища. Висушування центрифужних пробірок (бюксів) та фільтрів до постійної маси. Фільтри, вкладені у відкриті чашки Петрі, центрифужні пробірки та бюкси поміщають у сушильну шафу та витримують протягом 1 год при температурі 100-105 °С. Потім їх переносять в ексикатори з безводним хлоридом кальцію чи

концентрованою сірчаною кислотою. Чашки з фільтрами при цьому тримають закритими. Після охолодження в ексикаторі протягом 30 хв центрифужні пробірки (бюкси, фільтри) зважують на аналітичних вагах з точністю до 0,0001 г. Висушування в сушильній шафі та охолодження в ексикаторі проводять кілька разів, поки маса пробірки (бюкса) чи фільтра не досягне постійного значення і різниця при повторному зважуванні не буде перевищувати $\pm 0,0001$ г.

Центрифугування клітин мікроорганізмів. Бактеріальні та дріжджові клітини відділяють від культуральної рідини центрифугуванням. Для цього точно відміряний піпеткою об'єм ретельно перемішаної культури наливають у висушені центрифужні пробірки. Час центрифугування та число обертів залежать від розмірів клітин. Бактерії центрифугують 15-20 хв при 5-7 тис. об/хв, дріжджі — 5-10 хв при 3,5-4,0 тис. об/хв. Надосадову рідину обережно зливають, осад 1-2 рази промивають фізіологічним розчином або злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на літр води) і знову центрифугують при тому ж числі обертів. Після закінчення промивки воду зливають, осад залишають у центрифужній пробірці, якщо вона виготовлена зі скла. З поліетиленових пробірок осад 52 дистильованою водою кількісно переносять в попередньо висušений скляний бюкс.

Клітини міцеліальних грибів та актиноміцетів, а також дріжджів і бактерій можна відділяти від культуральної рідини, використовуючи обеззолені паперові чи мембранні фільтри. Подвійні паперові фільтри поміщають в скляні воронки чи воронки Бюхнера та фільтрують точно відміряний об'єм культури. Мутний фільтрат кілька разів повертають на фільтр. Для пришвидшення процесу фільтрацію можна вести під вакуумом. Осад на фільтрі ретельно промивають підкисленою дистильованою водою. Мембранні фільтри використовують для відділення бактеріальних клітин і підбирають таким чином, щоб розмір пор фільтрів був менший за розмір бактерій. Визначення маси клітин. Центрифужні пробірки (бюкси) чи фільтри з осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу та висušують 2 год при температурі 30 °C, потім при 100-105 °C. Перше зважування проводять через 4 год, інші — через 1 год. Перед кожним зважуванням пробірки, бюкси і фільтри охолоджують в ексикаторі. Для пришвидшення процесу висušування використовують вакуум-сушильні шафи з примусовою вентиляцією,

лампи інфрачервоного випромінювання. Біомасу на фільтрах можна швидко висушити в приладі К.Н. Чижової. В основу його конструкції покладений принцип зневоднення протягом 5-7 хв при температурі нагріву 160 °С тонкого шару досліджуваного зразка інфрачервоними променями, що виходять від темного нагрітого тіла.

Визначення концентрації ракіцидіну

Визначення концентрації ракіцидіну у культуральній рідині проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Культуральну рідину розбавляють 1,0 н НСІ у співвідношенні 1:1 і витримують при температурі 37 °С і 200 об/хв протягом години для забезпечення повного розчинення ракіцидіну. Далі суміш розбавляють в межах норм калібрування 0,1 н НСІ, перемішують і центрифугують при 13200 об/хв протягом 10 хв.

Концентрацію ракіцидіну у супернатанті визначають методом ВЕРХ на колонці Agilent серії 1100. Елюювання здійснюють лінійним градієнтом 0,1% трифтороцтової кислоти (ТФО) та ацетонітрилу. Здійснюють елюцію сумішшю 95% водного розчину ТФО і 5% ацетонітрилу протягом перших 3 хв, далі концентрацію ацеонітрилу лінійно збільшують до 70% з 3 до 10 хвилини. Детектування здійснюється УФ-детектором (Agilent Eclipse +C18) при довжині хвилі 220 нм [2].

Визначення концентрації джерела вуглецю

Визначення концентрації джерела вуглецю – глюкози, казеїну, – проводять за допомогою глюкозо аналізатора YSI 2700 [12].

Культуральну рідину центрифугують при 13200 об/хв. протягом 10 хв. Відбирають 10 мкл супернатанту. Вмикають аналізатор, при цьому з його корпусу автоматично витягається голка з ручним впорскуванням. Після того як голка для аспірації нерухома і повністю витягнута, обережно тримають пробірку, що містить пробу супернатанту так, щоб наконечник голки був занурений у зразок. Утримуючи зразок у цьому положенні, натискають «Аспіраційний зразок». Тримають зразок, доки голка для відсмоктування не повернеться назад до корпусу пристрою. Після цього починається аналіз зразку. Час аналізу становить 60 секунд [18,19].

Визначення концентрації джерела азоту

У середовищі міститься два джерела азоту: дріжджовий екстракт, триптон— джерело амонійного азоту.

Вміст амонійного азоту можна визначити мідним способом [17].

Культуральну рідину центрифугують при 13200 об/хв. протягом 10 хв. У мірну колбу місткістю 50 мл вносять 5 мл супернатанту. Додають 2-3 краплі тимолфталейну і 2-3 краплі 1 М розчину NaOH до появи блідо-блакитного забарвлення. У кілька прийомів, при перемішуванні, додають 15 мл суспензії фосфату міді (що складається з хлориду міді, тризаміщеного фосфату натрію і боратного буферного розчину у співвідношенні 1:2:2), потім вміст колби доводять до мітки дистильованою водою. Суміш перемішують і фільтрують через паперовий фільтр, повертаючи на фільтр перші порції фільтрату.

10 мл прозорого фільтрату поміщають в конічну колбу місткістю 150 мл і додають 0,5 мл 80% оцтової кислоти, 1 г або 10 мл 10% розчину KI. Вміст колби перемішують і вільний йод, який виділився, відтитровують 0,01 М розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1-2 краплі 1% розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення розчину.

Вміст амінного азоту в 100 мл культуральної рідини визначають за формулою:

$$x = \frac{a \cdot 0,28 \cdot 20}{100}$$

де a – об'єм 0,01 М розчину тіосульфату натрію, який пішов на титрування, мл;

0,28 - кількість мг амінного азоту, еквівалентний 1 мл розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 М;

20 – переведення в 100 мл культуральної рідини.

РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Метастазування пухлини це основна причина смерті онкологічно хворих. Це процес, за допомогою якого пухлинні клітини залишають первинну пухлину, поширюються у віддалені місця через систему кровообігу та встановлюють вторинну пухлину. Під час каскаду метастазів пухлинні клітини повинні пройти бар'єр позаклітинного матриксу, щоб завершити метастазування.[1]

Тому переривання метастазування є перспективним методом для лікування різних видів раку генетичного походження. Оскільки продовжують пошук протитінвайзійних сполук із вторинних метаболітів мікроорганізмів, з культурального відвару штамів актиноміцетів роду *Streptomyces* було виділено ракіцидин. Ракіцидини - це 15-членні депсипептиди, що складаються з трьох амінокислот та 3-гідроксигірних кислот. Ракіцидин містить рідкісну і незвичну амінокислоту, 4-аміно-2,4-пентадієнову кислоту, яка міститься лише у вторинних метаболітах актиноміцетів. На додаток до ракіцидинів, на сьогодні повідомляється лише про два типи циклічних пептидів, BE43547 та вінілміцин, що містять цю незвичайну амінокислоту. [2]

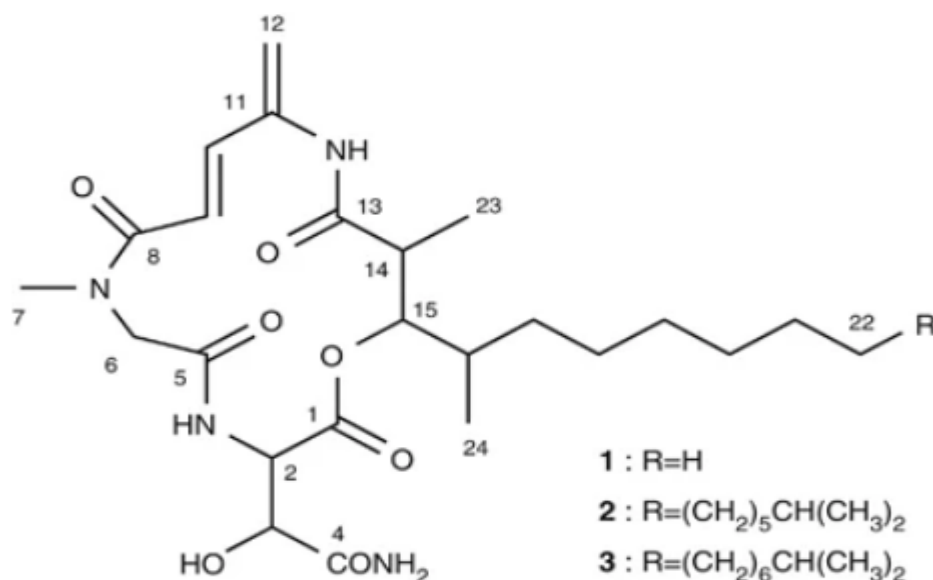


Рис. 1. Структура ракіцидину

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Терещук Л.О.			РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ			Літ.		Арк.		Акрушів	
Консульт.										77		177	
Керівник		Станікова О.В.						Кафедра БТМ					
Н. Контр.													
Зав. каф.		Стабніков В.П											

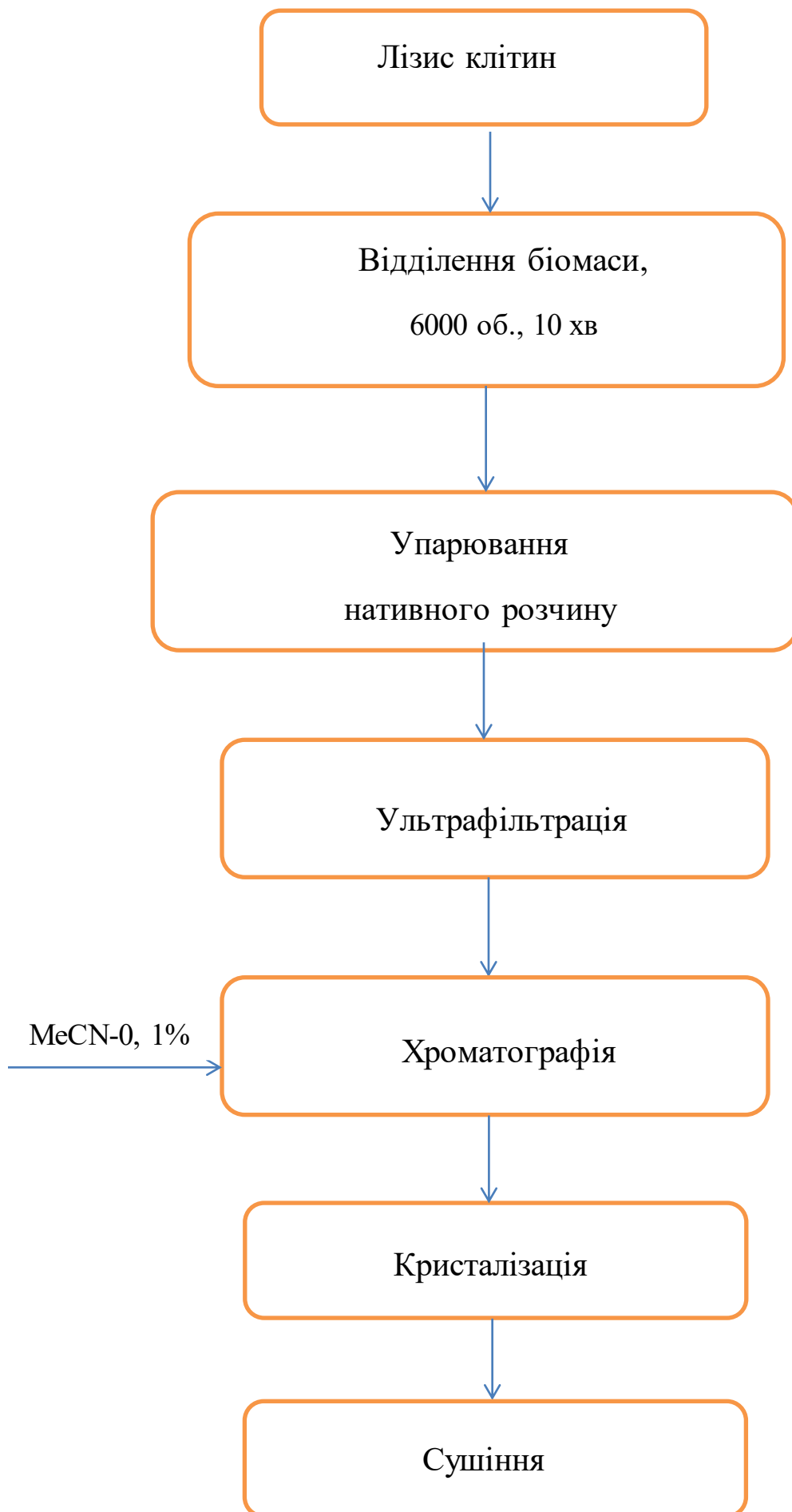
Ракіцидін є ензимометаболітом, тобто діюча речовина накопичується в основному в клітині, тому нам потрібно зруйнувати її для того, щоб вивільнити діючу речовину.

При виборі методу виділення і очищення ракіцидину необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини (КР);
2. Властивості продукту (стійкість до різних хімічних агентів, термолабільність);
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь його чистоти).

Отже, технологія виробництва препаратів високої чистоти включає такі основні етапи:

Схема отримання та очищення ракіцидіну:



Обґрунтування способу лізису клітин

Так як ракіцидін ендометаболіт (тобто діюча речовина в основному міститься у середині клітини та його міцелію) нам потрібно її зруйнувати. Для цього використовують різні механічні та немеханічні способи руйнування клітини.

Лужний лізис. При лужному лізисі іони OH^- є основним компонентом, який використовується для лізису клітинної мембрани. Буфер для лізису складається із гідроксиду натрію і додецилсульфату натрію (SDS). Іони реагують із клітинною мембраною та розривають жирних кислот гліцерину ефірних зв'язків і згодом робить клітинну мембрану проникною і SDS розчиняє білки і мембрану. Діапазон рН 11,5–12,5 є кращим для клітинного лізису. Хоча цей метод підходить для всіх видів клітин, цей процес дуже повільний і займає від 6 до 12 годин. Цей метод здебільшого використовується для виділення ДНК плазмід від бактерій

Термічний лізис. Лізис клітин можна проводити шляхом повторних циклів заморожування і розморожування. Це призводить до утворення льоду на самій клітинній мембрані, який допомагає руйнувати клітинну мембрану. Цей метод займає багато часу та не може бути використаний для вилучення клітинних компонентів, чутливих до температури. При механічному лізисі клітинна мембрана фізично руйнується за допомогою зусилля зсуву. Цей метод є найпопулярнішим та комерційно доступним через поєднання високої продуктивності і більш високої ефективності лізису. Немеханічний лізис можна класифікувати на три основні групи, зокрема фізичні, хімічні та біологічні, де кожна група додатково класифікується на основі конкретних прийомів та методів, які використовуються для лізису.

Гомогенізатор високого тиску (НРН) - одне із найбільш широко використовуваних приладів для масштабного руйнування мікробів. У цьому методі клітини у середовищі пропускаються через клапан із отвором за допомогою високого тиску. Порушення роботи мембрани відбувається через велику зсувну силу на отворі, коли клітина піддається стиску при вході з отвору на розширенню при розряді. Рис. 9.2 показує приклад комерційно доступної системи НРН. У цій системі використовуються два резервуари для зберігання, які чергують подачу та дають

можливість декількох проходів гомогенату. Для витягування суспензії комірки використовується насос із позитивним витісненням. Залежно від типу клітин потрібно 15–150 МПа

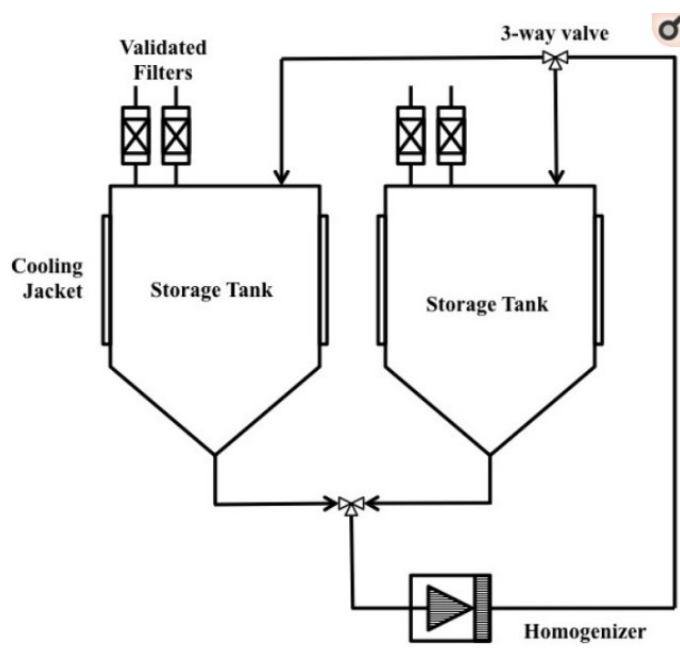


Рис. 9.1 Гомогенізатор високого тиску

Отже, із усіх методів найбільш ефективнішим є гомогенізатор високого тиску (НРН)

Гомогенізатор високого тиску складається із поршневого насоса високого тиску та гомогенізуючої напірного клапана. Тиск в гомогенізаторі створюється за допомогою одного або декількох поршневих насосів, які за допомогою керамічних поршнів забезпечують об'ємний витрата, незалежний від тиску та фактично без пульсації. Необхідний тиск гомогенізації встановлюється шляхом плавного регулювання. Тиск стравлюється через регульований зазор гомогенізуючої клапана. Різке зниження тиску в рідині, яке рухається викликає високу турбулентність та кавітацію для подрібнення продукту.



Рис 9.2 Гомогенізатор високого тиску ІКА

Гомогенізатори високого тиску ІКА конструюються із урахуванням індивідуальних завдань замовників. Можлива поставка гомогенізатори двох типорозмірів з одним або декількома поршнями різних діаметрів. Машини програми поставки відрізняються, таким чином, максимально можливим тиском гомогенізації (800 або 2.000 бар), мінімально допустимим обсягом оброблюваного продукту (від 10 мл), результатами гомогенізації і продуктивністю.

Переваги гомогенізатора високого тиску ІКА НРН:

- Максимально можливе застосування енергії, що дозволяє досягти подрібнення частинок до 0,1 мкм
- Випробувана конструкція і довгий термін служби
- Дуже низький рівень шуму
- Обробка проб об'ємом від 10 мл
- Доступні різні типорозміри і версії з продуктивністю від 2 до 100 л / год

- Надійний привід, який можна використовувати для промислового виробництва
- За запитом можлива поставка контролера для регулювання частоти обертання валу приводу з метою пристосування пропускну́ї здатності машини до плинності середовища
- Всі частини, що контактують з продуктом, виготовлені з нержавіючої сталі і кераміки
- Відсутність ущільнень в зоні обробки продукту
- Всі частини, що контактують з продуктом, можуть стерилізувати в автоклаві. За запитом пресдоставляються посвідчення FDA на матеріали, використовувані при виробництві машини

Обґрунтування способу відокремлення біомаси

Культуральна рідина після біосинтезу містить, окрім ракіцидіну, біомасу продуцента та продукти його життєдіяльності. Тому першою стадією виділення цільового продукту становить відділення біомаси продуцента.

Існує декілька способів відокремлення біомаси продуцента та твердої суспензії середовища, такі як флотація, сепарування, центрифугування, фільтрування, осадження.

Перевагами флотації є:

- ❖ економічність,
- ❖ висока продуктивність;
- ❖ можливість використання у безперервних процесах [7].

Але даний метод найчастіше використовують при виробництві продуктів на основі біомаси, а для одержання супернатанту культуральної рідини флотацію не є доцільним у використанні, оскільки відбувається неповне відділення біомаси, її частина залишається в культуральній рідині та заважатиме подальшому очищенню продукту [5].

Перевагами методу фільтрації є:

- ❖ Менші енерговитрати;
- ❖ Простота методу;
- ❖ Селективність.

Проте недоліками є:

- налипання клітин на фільтрі, шар яких знижує швидкість потоку рідини у процесі фільтрування;
- фільтрація є процесом енергоємним та тривалим за часом;
- потрібно постійна заміна фільтруючих перегородок.

При фільтрації деяких культуральних рідин питомий опір драглистого осаду, який утворюється, дуже великий. Навіть тонкий шар осаду, що залишається після зрізання ножом, призводить до різкого зниження швидкості фільтрації [4].

Найпростіший випадок седиментації - відстоювання застосовують при наступних випадках:

- ✓ діаметр частинок більше 3 мкм;
- ✓ виділення стабільних продуктів, коли фактор часу не має вирішального значення;
- ✓ більш низьких, ніж при інших методах, витратах.

Проте істотним недоліком даного методу є те, що швидкість осадження біомаси із культуральної рідини невелика.

Сепарування використовують для розділення, очищення, концентрування, прояснювання, для поетапної обробки рідини, наприклад, послідовного відділення грубодисперсного осаду із тонкодисперсних суспензій.

Істотним недоліком сепараторів становить швидка забиваємість мундштуків та міжтарільчатого простору механічними включеннями і мертвими дріжджами [7].

Центрифугування має такі переваги:

- ❖ відокремлення біомаси бактерій відбувається набагато швидше, ніж при фільтрації;
- ❖ відбувається максимальне очищення культуральної рідини від біомаси і залишків компонентів поживного середовища;
- ❖ висока продуктивність;
- ❖ можливість застосування для суспензій із високою концентрацією твердих частинок.

Найбільш досконалими по конструкції вважаються центрифуги осаджувальні.

Центрифуги осаджувальні шнекові застосовуються для зневоднення тонких незбагачених шламів, флотаційних концентратів та, в окремих випадках, відходів флотації. Для зневоднення флотаційних концентратів, які важко фільтруються, і шламів застосовуються осаджувально-фільтрувальні центрифуги.

Вихідна пульпа завантажувальним пристроєм подається до середини шнека та через отвори в ньому надходить до ротора. У роторі відбувається відцентрове осадження частинок та розділення суспензії на тверду та рідку фази. Тверда фаза шнеком переміщується до розвантажувальних патрубків, через які вона відцентровими силами розвантажується із ротора. Рідка фаза по спіральних каналах, які створені витками шнека та стінкою ротора, рухається у протилежному напрямку та витікає через зливні вікна. Відсаджувальні центрифуги ОГШ застосовують для зневоднення дрібних розріджених продуктів, що містять від 10 до 50 % твердого за масою.

Центрифуги осаджувальні (рис. 9.4) застосовують для розділу погано фільтруючих суспензій, емульсій, для розділу суспензій із порівняно великим розміром часток твердої фази [71].

Отже ракіцидін отримують в такий спосіб, осад відокремлюють центрифугуванням при 6000 об/хв на 10 хв.

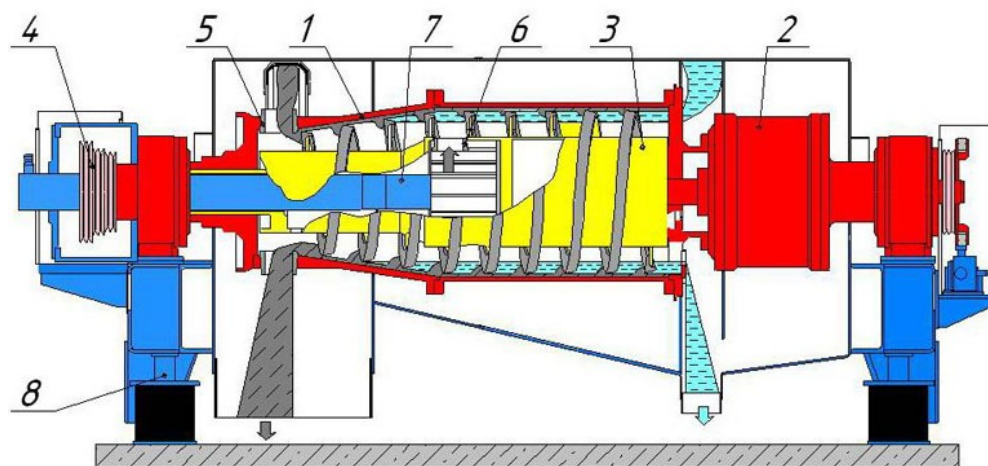


Рис. 9.3. Центрифуга типу ОГШ: 1 – ротор, 2 – редуктор, 3 – шнек, 4 – шків ротора, 5 – вікна вивантаження осаду, 6 – завантажувальні вікна, 7 – труба живлення, 8 – опора.

Осаджувально-фільтрувальна шнекова центрифуга типу ОГШ-1350Ф (рис.) створена на базі центрифуги ОГШ-1350 та відрізняється від неї наявністю фільтрувального ступеня 9.

Шнек 8 фільтрувального ступеня закріплений на конічній частині ротора 2. Фільтрувальна поверхня це шпальтове сито. Цапфа фільтрувального ступеня жорстко з'єднана із шнеком. У центрифугі ОГШ-1320Ф осад відсаджувального ступеня додатково зневоднюється у фільтрувальному ступені. Центрифуга ОГШ-1320Ф призначена для більш глибокого зневоднення шламів і флотоконцентратів, зневоднення яких на дискових вакуум-фільтрах здійснюється незадовільно, наприклад, зневоднення важкофільтрованих флотоконцентратів вугілля марок Г і П. Технологічні показники осаджувальних центрифуг такі: винос твердого у фугат 25—35 %; вологість осаду: концентратів флотації 20—25 %, відходів флотації 22—30 %, шламу 17—22 %. С Так як об'єм культуральної рідини, що йде на центрифугування, становить 400 л, то доцільно використовувати центрифугу марки ОГШ-352К-04 (рис.1.1), з продуктивністю 0,3-3 м³/год.



Рис.9.4. Зовнішній вигляд центрифуги ОГШ-1350Ф

Обґрунтування способу концентрування супернатанту

Після відділення продукту наступним етапом є його концентрування за допомогою основних методів – випарювання чи мембранних методів – ультрафільтрації, мікрофільтрації, зворотнього осмосу.

При використанні методу **зворотного осмосу** супернатант поміщається у ємність із напівпроникною мембраною, зовні створюється осмотичний тиск, який перевищує осмотичний тиск розчину-супернатанту, в результаті чого розчинник

починає витікати через мембрану проти градієнта концентрації розчиненої речовини, обумовлюючи подальше концентрування розчину [7].

Перевагами зворотнього осмосу є:

- ✓ висока продуктивність;
- ✓ простота конструкції;
- ✓ невелика енергоємність.

Проте є і ряд недоліків:

- необхідність періодичного очищення фільтра хімічними реагентами;
- дороговизна промислових систем
- у сконцентрованому розчині разом із цільовим продуктом залишаються усі

низькомолекулярні домішки.

Мікрофільтрація це гідродинамічний процес, близький до звичайної фільтрації. Специфічна особливість мікрофільтрації - використання мембран із діаметром пор від 0,1 до 10 мкм для відділення дрібних частинок твердої фази, у тому числі мікроорганізмів, в цьому випадку її називають стерилізуючою фільтрацією. Тому на відміну від процесу фільтрації при мікрофільтрації явища дифузії (особливо при невеликих розмірах пір від 0,1 до 0,5 мкм) також відіграють певну роль [7].

Ультрафільтрація є способом поділу речовини (вірніше його концентрування) за допомогою мембранних фільтрів.

Технологія ультрафільтрації приваблює своєю простотою, відносною економічністю, відсутністю руйнування продукту, оскільки процес здійснюється за помірно низького зовнішнього тиску. Крім того, у даному методі не потрібна зміна рН, іонної сили розчину або переведення продукту у іншу фазу. Тому метод перспективний при концентруванні малостабільних продуктів (амінокислот, антибіотиків і ферментів).

В основі **ультрафільтрації** лежить використання мембран із діаметром пор від 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафільтрація застосовується для поділу клітин та молекул.

Мембранні методи розділення мають ряд переваг.

1. Концентрація та очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень;

2. Цільовий продукт не піддається тепловим та хімічним впливам;
3. Механічний і аеродинамічний вплив на біологічний матеріал незначний;
4. Легко забезпечуються герметичність та асептичні умови;
5. Апаратурне оформлення компактне по конструкції, відсутні рухомі деталі;
6. Процес не володіє високою енергоємністю, у більшості випадків енергія витрачається тільки на перекачування розчинів [7].

Проте за допомогою ультрафільтрації і мікрофільтрації можна сконцентрувати розчини, що містять великі молекули (білки, ферменти).

Випарювання – це процес концентрування розчинів шляхом часткового видалення розчинника випаровуванням при нагріванні рідини. У ряді випадків упарений розчин піддають подальшій кристалізації.

Концентровані розчини та тверді речовини, одержувані у результаті упарювання, легше та дешевше переробляти, зберігати і транспортувати [7].

Метод випарювання найдавніший та має істотний недолік: для видалення розчинника супернатант слід нагрівати. У виробничих умовах частіше застосовуються вакуумні випарні апарати, які забезпечують більш щадний режим концентрування. Нагрівачим агентом зазвичай служить водяна пара, хоча використовується також обігрів рідким теплоносієм або електричними нагрівачами.

Випарні апарати бувають періодичної і безперервної дії з циркуляцією киплячого розчину. З метою досягнення рівномірного обігріву розробляються різного роду конструктивні удосконалення систем випарювання.

Проте головний недолік випарювання полягає у тому, що при цьому не відбувається очищення цільового продукту від домішок та залишків біомаси.

Отже, серед наведених методів найдоцільніше обрати випарювання, оскільки об'єм супернатанту великий, а даний метод є високопродуктивним, забезпечує високий ступінь концентрування, а також даний метод забезпечує найменші втрати цільового продукту.

Процес випарювання у промисловому масштабі переважно здійснюється у роторно-плівкових випарних апаратах (*рис. 1.3*).

У даних апаратах випарювання вихідного продукту (супернатанту, що містить цільовий продукт) відбувається в випарних трубах, всередині яких вбудовані

обертові турбулізуючі механізми роторного типу. Супернатант подається через патрубок у верхній частині кожної з труб. Він розтікається рівномірно по перетину труби роторно-плівкового випарника і стікає по внутрішній поверхні вниз у вигляді плівки під дією сили тяжіння; по поверхні плівки «гліссирують» робочі органи роторного механізму. Труба зовні підігрівається паром до температури випаровування. Обертові лопаті роторно-плівкового випарника створюють в плівці вихрові структури, що прискорюють в ній тепло-масообмінні процеси, забезпечують ефективне розділення рідкої і парової фаз при випаровуванні.

Основними перевагами роторно-плівкового випарника є:

- не утворюються відкладення на нагрівачі при температурі випаровування до 150 °С;
- використання великої різниці температур між гріючим і випаровуваним середовищами, що дозволяє повністю зберегти цільовий продукт;
- низька металоємність конструкції;
- модульність і технологічність конструкцій;
- високий енергетичний потенціал вторинної пари;
- високий ступінь випарювання.



Рис. 9.5. Роторно-плівковий випарний апарат фірми «Гранд»

Ультрафільтрація нативного розчину

За відділенням продукту слід етап його концентрування за допомогою основних методів – випарювання або мембранних методів – ультрафільтрації, мікрофільтрації, зворотнього осмосу.

Ультрафільтрація є способом поділу речовини (вірніше його концентрування) за допомогою мембранних фільтрів.

Технологія ультрафільтрації приваблює своєю простотою, відносною економічністю, відсутністю руйнування продукту, оскільки процес здійснюється за помірно низького зовнішнього тиску. Крім того, в даному методі не потрібна зміна рН, іонної сили розчину або переведення продукту в іншу фазу. Тому метод перспективний при концентруванні малостабільних продуктів (амінокислот, антибіотиків і ферментів).

В основі **ультрафільтрації** лежить використання мембран з діаметром пор від 0,001 до 0,1 мкм. Ультрафільтрація застосовується для поділу клітин і молекул.

Мембранні методи розділення мають ряд переваг.

1. Концентрація і очищення здійснюються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень;
2. Цільовий продукт не піддається тепловим і хімічним впливам;
3. Механічний та аеродинамічний вплив на біологічний матеріал незначний;
4. Легко забезпечуються герметичність і асептичні умови;
5. Апаратурне оформлення компактне по конструкції, відсутні рухомі деталі;
6. Процес не володіє високою енергоємністю, в більшості випадків енергія витрачається тільки на перекачування розчинів [7].

Проте за допомогою ультрафільтрації та мікрофільтрації можна сконцентрувати розчини, що містять великі молекули (білки, ферменти).



Рис 9.6. Системи ультрафільтрації UF

Ультрафільтрація низько-молекулярних частинок в супернатанті

Стандартні функції:	Доступні опції:
• UF модулі (ПВХ) • Насос зворотного промивання з нержавіючої сталі • 150 мкм змивається екран • Розклад 80 Труби з ПВХ • Панель управління мікропроцесором • Стартери двигуна • Корпус NEMA 12 • Реле перепаду тиску • Манометри, наповнені рідиною (кріплення на панелі) • Клапани з електричним приводом • Витратомір	• Покращена хімічно промивка (СЕВ) • Окислювач подачі/зворотного промивання (система дозування) Мембранний очищувач (CIP) • Джерело живлення 380-415В/3Ph/50Гц • Інтернет -монітор мутності • Багатоступеневий насос подачі з нержавіючої сталі • Насос подачі VFD • PLC + HMI • Бак фільтрату (зворотного промивання) (ПНД) • Перетворювачі тиску • Повітрорудувка (для зворотного промивання) • Двосторонній екран 2205 (проти SS 316)
Особливості експлуатації:	
• Джерело живлення: 460V/3Ph/60Hz • Температура 25 ° C (макс. 40 ° C) • ТОС <10 макс. <40 мг/л	• рН 6-9 (очищення 2-11) • TSS <50 макс. <100 мг/л • Частота зворотного промивання 20-60 хвилин • Помутніння <50 макс. 300 НТУ • СІ2 0,5 проміле (2000 очищення) • ХПК макс. <60 мг/лм

Так як ми попередньо відділили високомолекулярні часточки з розчину в ньому ще містяться і низькомолекулярні, тому доцільно використати ультрафільтрація з діаметром пор для низькомолекулярних часточок.

Для цього етапу ми використовуємо ту ж ультрафільтраційну установку, але з меншим діаметром пор (розмір пор від 0,005 до 0,05 мікрон (5...50 нанометрів)).

Хроматографія нативного розчину

Хроматографія у фармацевтичному аналізі — методи хроматографічного розділення речовин — це багатоступінчасті методи, в яких компоненти зразка розподіляються між двома фазами, одна з яких є нерухомою (стаціонарною), а інша — рухомою. Нерухома фаза може бути твердою або рідкою, нанесеною на твердий носій або гель. Нерухома фаза може бути упакована в колонку, нанесена як шар або як плівка. Рухома фаза може бути газом чи рідиною або флюїдом (газом у надкритичному стані). Розділення може ґрунтуватися на адсорбції, розподілі, іонному обміні, їх комбінації тощо, або на відмінностях у фізико-хімічних властивостях молекул (розмір, маса, об'єм тощо). Хроматографія. може використовуватися для отримання чистих сполук (препаративна хроматографія.), кількісного та якісного визначення розділених компонентів (хроматографічний аналіз), а також для визначення фізико-хімічних характеристик розділених сполук.

Використання **хроматографічного** методу дає цілу низку **переваг**.

По-перше, речовини під час розділення, в основному, не змінюються, що є дуже важливим для подальших біохімічних досліджень. По-друге, цей метод цілком придатний для розділення рідких та газоподібних сполук.

Ацетонітрил (MeCN) і метанол (MeOH) є найбільш часто використовуваними органічними модифікаторами в хроматографії з оберненою фазою. Хоча обидва розчинники мають певні переваги та недоліки, одна з їх ключових переваг, з хроматографічної точки зору, полягає в тому, що вони пропонують істотно різну селективність, і як такі є цінними для цілей розробки методу. Ацетонітрил має нижчу границю УФ-випромінювання, ніж метанол (190 нм проти 205 нм), що робить його більш придатним для використання у сферах застосування, де потрібна низька довжина хвиль виявлення УФ (проте зауважте, що для ЖХ важливо використовувати клас ВЕРХ або кращі розчинники) аналізу). В додаток, суміші

ацетонітрил/вода мають меншу в'язкість, ніж суміші метанол/вода, і тому створюють істотно нижчий зворотний тиск у колонці ЖХ. Цей нижній протитиск часто вважається вигідним, оскільки він зменшує навантаження на компоненти системи LC та колону, а також дає можливість збільшити витрату та скоротити час роботи.[7]



Рис 9.7. Хроматограф DW-GC1120

Модель, в якій втілені найвищий рівень базового виконання окремих компонентів, надійність і продуктивність. Модель розроблялася для тривалої роботи в автономному режимі (без участі оператора). Звідси - високий ступінь автоматизації, довговічність витратних компонентів, можливість управління системою від віддаленого комп'ютера (через Інтернет). Модель має блочну конфігурацію, що дозволяє користувачеві створювати систему, оптимальну для конкретних завдань.

Новий термостат СТО-30А дозволяє проводити хроматографічне розділення при температурах до 150 ° С. Термостат додатково оснащений підігрівачем для подвижної фази і двома слотами для установки клапанів переключення потоків рухомий фази.

Діапазон температур :	Температура навколишнього середовища +7 °С ~ 400 °С (з кроком 1 °С)
Точність температури :	± 0,02 °С
Час охолодження :	400 °С до 50 °С за 8-10 хвилин при 25 °С навколишньому середовищі
Запрограмоване налаштування температури :	0,1 °С ~ 40 °С/хв (з кроком 1 °С)
Програмні пандуси :	Всього 7 пандусів (10 пандусів доступні з робочим місцем управління)
Межа виявлення :	≤3*10 ⁻¹² г/с (С16)
Найкращий результат тесту :	≤3*10 ⁻¹² г/с (С16)
Дрейф :	≤6*10 ⁻¹³ А/30 хв
Шум :	≤5*10 ⁻¹⁴ А

Кристалізація нативного розчину

Кристалізація відбувається при досягненні граничних умов, наприклад, перенасичення пари або переохолодження рідини, коли практично відразу виникає багато дрібних кристаликів - центрів кристалізації.



Рис. 9.9. Кристалізатор з примусовою циркуляцією (FC)

Принцип роботи:

звичайний кристалізатор із примусовою циркуляцією випаровує розчинник та за допомогою цього збільшуючи ступінь перенасичення який у свою чергу надходить на переробку розчинів та викликаючи цим кристалізацію. Більшість кристалізаторів із примусовою циркуляцією працюють під тиском або під вакуумом, який є трохи вище атмосферного. До кристалізатора із примусовою циркуляцією входить чотири основних компонента: судини кристалізатора, що забезпечує більшу частину обсягу, визначеного вимогами часу витримування за допомогою циркуляційного насоса, що забезпечує енергію змішування, теплообмінником, який подає енергію до кристалізатора та разом з вакуумним обладнанням, що обробляє пари, які утворюються у кристалізаторі.

Суспензія із посудини кристалізатора циркулює витіснювальним рухом рідини за допомогою теплообмінника та знову повертається до посудини кристалізатора, де її пересичення забирають за допомогою осаджувального матеріалу на кристалах, присутніх у суспензії. Ступінь перенасичення контролюють так, щоб уникнути неочікуваного пароутворення, через інтенсивну циркуляційну здатність.

Випарений розчинник подається до вакуумної системи, де він одночасно конденсується та видаляється. [7]



Рис 9.10. Кристаллизатор з примусовою циркуляцією (FC)

Наступна дія при виділенні ракіцидіну: додаємо до кристалів воду, нагрівають до 65-70°C та кристалізують.

Кристалізація відбувається при пониженні температури до 6-8°C протягом 5 год після цього кристали пропускають через нутч-фільтр.

Сушіння

Сушка є один із найпоширеніших технологічних процесів, який використовується у хімічній, харчовій та фармацевтичній промисловості. Дійсно важко знайти таке фармацевтичне та хімічне виробництво, на якому не було б такої операції як сушіння тієї чи іншої речовини або препарату. Часто сушка є завершальним етапом технологічного процесу із отриманням цільового продукту.

Цілями є:

- Полегшення та здешевлення транспортування матеріалів та для підвищення їх міцності;
- забезпечує їх консервування і зберігання;
- Сушка необхідна для подальшого подрібнення інших матеріалів промисловості.
- Сушка є процесом видалення вологи із твердого чи пастоподібного матеріалу шляхом випаровування рідини, яка в ному за рахунок підведеного до оброблюючого матеріалу тепла.

За способом підведення тепла розрізняють такі види сушіння:

1. Конвективна за рахунок безпосереднього зіткнення висушуваного матеріалу із сушильним агентом, найчастіше використовують нагріте повітря чи топкові гази (в суміші з повітрям).
2. Контактна за рахунок передачі тепла від теплоносія до матеріалу через їх стінку.
3. Спеціальна.

Тунельні сушарки відрізняються від камерних тим, що в них з'єднані один із одним вагонетки повільно переміщаються на рейках уздовж дуже довгою камери прямокутного перетину (коридору). На вході та виході сушарки знаходяться герметичні двері, які відкриваються для завантаження та вивантаження матеріалу. Вагонетка із висушеним матеріалом видаляється з камери, а із протилежного кінця в неї надходить нова вагонетка вже з вологим матеріалом. Переміщення вагонеток є механізованим. Сушильний агент може подаватися противотоком чи прямоотоком.

Такі сушарки працюють із частковою рециркуляцією сушильного агента та використовуються для сушіння великих кількостей штучного матеріалу.

Істотний недолік - нерівномірність сушіння внаслідок розшарування вже нагрітого та холодного повітря.

Контактна сушка здійснюється шляхом передачі тепла від теплоносія до матеріалу через стінку, яка їх розділяє, які діляться на періодично та безперервно діючі. Висушування при зниженому тиску у замкнутому просторі використовується при тих випадках, коли матеріал чутливий до дії високих температур.

Найпростішими контактними сушарками періодичної дії є **вакуум-сушильні шафи**, які в даний час широко використовуються у виробництвах із малотоннажним випуском та різноманітним асортиментом. До таких належить фармацевтичне виробництво, де застосування високопродуктивних механізованих сушарок безперервної дії економічної точки зору недоцільно.

Вакуум-сушильна шафа являє собою циліндричну камеру, у якій розміщені порожнисті плити, обігріваються зсередини парою чи гарячою водою. Висушуваний матеріал у вигляді згущеної сметаноподібної маси намазується на дека (товщиною 0,5-4 см), які встановлюють на плити. Камеру герметично закривають за допомогою дверцят та з'єднують патрубком із вакуумною лінією. Сушіння відбувається під вакуумом при температурі близько 50 ° C, що також залежить від глибини вакууму.

При цьому утворюється високий (до 15-20 см) шар пористого легкого матеріалу, який добре розчиняється у воді. Вивантаження матеріалу проводиться вручну. Такі сушарки придатні для сушіння легкоокислюючихся, вибухонебезпечних і виділяють шкідливі або цінні пари речовин. Однак вони малопродуктивні і малоефективні, оскільки сушка в них відбувається в нерухомому шарі при наявності погано провідних тепло зазорів між листами і гріючими плитами. Напруга робочої поверхні плит з боку матеріалу зазвичай не перевищує 0,5-2,5 кг / (м³ · год) вологи. [7]



Рис 9.11. Вакуумна сушильна шафа серії СВ

Опис і застосування шафа сушильна СВ:

Вакуумна сушильна шафа серії СВ розроблений спеціально для делікатної низькотемпературної (до 200 ° С) термічної обробки біологічних зразків і швидкої сушки матеріалів або термічно нестійких речовин в розрідженому повітрі (в вакуумі до 0,01 атм). Також вакуумна сушильна шафа СВ призначений для сушки матеріалів в інертному середовищі, що запобігає процес окислення. Вакуумні сушильні шафи СВ виробляються в трьох стандартних обсягах: 30л, 50л і 80 л. Шафи вакуумні СВ комплектуються вакуумними насосами за запитом.

Застосування шафа вакуумна сушильна СВ:

- швидка сушка зразків з інтенсивним відведенням парів і газів;
- рівномірна сушка зразків у вакуумі;
- низькотемпературна обробка термічно нестабільних зразків в розрідженому повітрі;
- сушка фармацевтичних препаратів і вихідних речовин без нагрівання або при низькій температурі;

- пробопідготовка рідких і грузлих зразків;
- можливість заповнення камери вакуумного шафи інертним газом, що усуває при сушінні процес окислення.

Матеріал шафи сушильної СВ:

Камера сушильної шафи СВ і полки, які мають безпосередній контакт з продуктом, виконані з нержавіюча сталь марки AISI 304. Зовнішній корпус шафи виготовлений зі сталі з полімерним порошковим покриттям.

Переваги сушильна шафа СВ:

- автоматичне регулювання і підтримка температури;
- мікропроцесорний PID контролер з ЖК-дисплеєм, дозволяє зберігати в пам'яті до 9 програм;
- вбудований програмний таймер до 99 годин 59 хвилин;
- цифрова настройка температури з точністю в один градус;
- всі електричні компоненти ізолювані від внутрішньої камери;
- вбудований аналоговий вакуумметр;
- штуцер для підключення до вакуумного насосу;
- голчастий вентиль для регульованої подачі інертного газу або стравлювання повітря;
- камера і полки виготовлені з нержавіючої сталі AISI 304;
- герметичне силіконове ущільнення і надійний фіксатор дверей;
- пристрій захисту від перегріву.

Опції шафа сушильна СВ:

- інтерфейс для підключення до комп'ютера і управління роботою шафи;
- комплектація спеціальними піддонами і полками;
- оглядове скло з термостійкого скла;
- можливість виробництва нестандартних шаф або шаф спеціального призначення;
- підставка для шафи вакуумної;
- підставка для насоса вакуумного;
- вакуумна насос.

Технічні характеристики шафа вакуумна сушильна СВ:

Модель шафи	Сушильна шафа СВ-30	Сушильна шафа СВ-50	Сушильна шафа СВ-80
Обсяг, л	31	52	81
Ширина шафи, мм	500	550	620
Глибина шафи, мм	570	650	670
Висота шафи, мм	640	690	760
Ширина камери, мм	300	350	420
Глибина камери, мм	370	450	470
Висота камери, мм	300	350	420
Температурні характеристики			
Мінімальна температура нагріву, ° C	кімнатна +5 ° C	кімнатна +5 ° C	кімнатна +5 ° C
Максимальна температура нагріву, ° C	200 ° C	200 ° C	200 ° C
Максимальне відхилення температури за обсягом камери, ° C	4,0 .. 8,0	4,0 ... 8,0	4,0 ... 8,0
Час нагрівання до 70 ° C, хв	50	50	70
Час нагріву до 150 ° C, хв	60	60	90
Час нагріву до 200 ° C, хв	120	150	200
Потужність, Вт	900	1600	1600
Номінальна напруга, В	220	220	220
Вага, кг	31	52	71

Подрібнення ракіцидіну

Після сушіння наш продукт необхідно подрібнити. Для цього процесу використовуємо промислову дробарку з циліндрами.



Рис 9.11. Дробарка з циліндрами та з подрібнювачем PGS 165 A

Принцип роботи:

з бункера сировина потрапляє в камеру подрібнення, обертаючись зі швидкістю 2800 об/хв молотки розбивають сировину об стінки, подрібнену сировину проходить через сітку обраної фракції. Збір подрібненої сировини відбувається в фільтр-рукав.

Особлива форма частин камери подрібнення створює тягу, таким чином створюється повітряне охолодження проходить потоком повітря. Завдяки системі захисту, при відкритій кришці камери подрібнення неможливо запустити двигун.

У комплект входять сита 4-х розмірів, для їх зміни необхідна 1 хвилина. При необхідності можна замовити сита іншої фракції.

На корпусі розташований рідко-кристалічний екран на який виводиться інформація про напругу в електромережі і стан роботи двигуна, таким чином можна дотримуватися необхідне навантаження на двигун. [7]

Просіювання ракіцидіну

Після подрібнення ракіцидіну необхідно здійснити просіювання препарату, для того щоб відсіяти неподрібнені частинки, та забезпечити однорідність розмірів часток готового продукту.

Аналіз розмірів і розподілу часток дуже важливий для досліджень і розробки, виробництва, контролю якості та моніторингу продукції.

Просіваюльна машина RETSCH AS 200 control (рис. 1.8) має такі переваги: короткий час просіювання, точність аналізу і зручність в роботі, а також відповідність вимогам стандарту ISO 9001, простота експлуатації, ергономічний дизайн, не потребує технічного обслуговування.

Максимальна кількість продукту для просіювання: 100 кг. Час розсівання - 10 хв [29]. [7]



Рис. 9.12. Просіваюльна машина RETSCH AS 200 control

РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведено в *табл. 10.1.*

Таблиця 10.1

Специфікація обладнання ділянки післяферментаційних робіт виробництва ракіцидіну

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Н-2, Н-5, Н-8, Н-10, Н-14, Н-18, Н-19, Н-20, Н-22	Насос відцентровий	9	Відцентровий насос з нержавіючої сталі фірми «спецтехсервис-99» (Україна), продуктивність 20 м ³ /год, потужність 5,5 кВт [3]
Р-1	Реактор-змішувач для культуральної рідини	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 1 м ³ , оснащений перемішуючим пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна) [2].
1	2	3	4
Ц-2	Центрифуга осаджувальна	1	Центрифуга безперервної дії, осаджувальна, горизонтальна, зі шнековим вивантаженням осаду марки ОГШ-352К-04 виробник Сумське НПО ім.Фрунзе (Україна), продуктивність 5-7 м3/год [5].
Уф-4	Роторно-випарна установка	1	Роторно-плівковий випарний апарат фірми «Гранд»

НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розроб.	Терешук Д.О.									100	177	
Консульт.								Кафедра БТМ				
Керівник	Станікова О.В.											
Н. Контр.												
Зав. каф.	Стабніков В.П											

Ф-6 З-7 Н-8 Ф-9 УФ-6	Установка для ультрафільтрації	1	UF модулі (ПВХ), Насос зворотного промивання з нержавіючої сталі 150 мкм змивається екран, Розклад 80 Труби з ПВХ, Панель управління мікропроцесором, Стартери двигуна, Корпус NEMA 12, Реле перепаду тиску, Манометри, наповнені рідиною (кріплення на панелі), Клапани з електричним приводом Витратомір
Хр-15	Хроматограф	1	Хроматограф DW-GC1120 складається з Насос LC-30AD, Автодозатор SIL-30A, СТО-30A термостат колонок для аналізів при температурі до 150 ° С.
КР-16	Установка для кристалізації	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 1 м ³ , в комплект входять верхня камера, нижня камера, кип'ятильник та нутч-фільтри [2].
ВСШ-22	Вакуум-сушильна шафа	1	Камера сушильної шафи СВ і полки, які мають безпосередній контакт з продуктом, виконані з нержавіюча сталь марки AISI 304. Зовнішній корпус шафи виготовлений зі сталі з полімерним порошковим покриттям.
Др-23	Дробарка з циліндрами та з подрібнювачем	1	Дробарка з циліндрами та з подрібнювачем PGS 165 А, складається з бункера, камера подрібнення, молотки для подрібнення, фільтрував. Виробник ООО "НПФ" Промисленая техника" (Україна) [10].
ПМ-24	Просіювальна машина	1	Просіювальна машина AS 200 control, виробник RETSCH (Німеччина) [11].

Примітка: підбір обладнання відбувався за допомогою таких електронних ресурсів:

- 1 - http://www.sineps.com.ua/industry_solutions/cip
- 2 - <https://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhavayuschej-stali.html>
- 3 - <https://prom.ua/p7122901-nasos-tsentrobeznyj-1g2.html>
- 4 - <https://zaporozhe.flagma.ua/obemno-vesovoy-dozator-o948088.html>
- 5 - <http://www.oborud.info/product/jump.php?22627&c=1453>
- 6 - http://www.mediana-filter.ru/kh4_44.html
- 7 - <http://snpo.ua/ru/produkts/tsentrifugi/tsentrifugi-filtruyushhie-i-osaditelnye-s-nozhevoj-vygruzkoj-osadka-tipa-fgn-i-ogn/>
- 8 - <https://biotechno.ru/catalog/vydelenie-i-ochistka-produkta1/sistema-prochrom-varicol-multicolumn/>

https://www.google.com.ua/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjCxtv6osbhAhUGllsKHYqxCdYQFjACegQIBhAC&url=http%3A%2F%2Farchive.promoboz.com%2Fn3_32%2F78-80.pdf&usg=AOvVaw2DmavYw6M1DPyaJdK6R8X6

10 – <http://proflab.com.ua/produkt/product-details/1667-mel-nica-laboratornaya-sharovaya-mshl.html>

11 - http://www.macrolab.com.ua/catalog/preparation_of_laboratory_tests/sieving/

12 - <https://service-pack.kiev.ua/fasovochnyj-avtomat-karetochnogo-tipa-fakt-v2-s-vesovym-dozatorom/>

РОЗДІЛ 11. ВИКЛАДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Технологічна схема стадій виділення та очищення інозину включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва) та технологічний процес (стадії відділення біомаси, Освітлення, концентрування, кристалізація, подрібнення, просіювання та пакування).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає навчання персоналу та перевірку знань персоналу. Періодично персонал проходить технологічний інструктаж. Також навчання персоналу включає вивчення посадових інструкцій, правил внутрішнього розпорядку підприємства, вивчення вимог санітарії, правил особистої гігієни, заходів пожежної безпеки, правил охорони праці і техніки безпеки.

ДР 1.2. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину «Біомою» для миття обладнання

Для здійснення миття ємнісної апаратури, збірників, реакторів необхідно 3633 л 0,3%-го «Біомою».

Для його приготування у реактор-змішувач (Р-3) об'ємом 5 м³, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) вносять 10,9 кг порошку «Біомою» та додають 3622 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину «Дезактину» для миття поверхонь

Для дезінфекції поверхонь необхідно приготувати 0,2% розчин «Дезактину». У збірник (З-9), об'ємом 1 м³ додають 1 кг порошку «Дезактину» та 500 л водопровідної води.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

На виробництві з метою дотримання чистоти проводять щоденне та генеральне прибирання (1 раз на місяць) приміщень.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 11. ВИКЛАДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Терешук Л.О.								
Консульт.									100	177
Керівник		Станікова О.В.						177		
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стабніков В.П.								

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання приміщень

При щоденному прибиранні здійснюють миття підлоги.

Для щоденного прибирання виробничих приміщень використовують 0,2%-ий розчин «Дезактину» (від ДР 1.2.2).

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання приміщень

Прибирання проводиться один раз на місяць. Здійснюють миття дверей, вікон, підлоги, обробляють поверхні лабораторних приміщень: столи, стіни.

При генеральному прибиранні виробничих приміщень використовують 0,2%-ий розчин «Дезактину» (від ДР 1.2.2).

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання

ДР 1.4.1. Миття обладнання

Миття обладнання проводять після кожного виробничого циклу за допомогою СІР-мийки. Реактори та збірники комплектуються системою автоматичної мийки СІР (СІР-1). На верхню кришку обладнання встановлюється кульоподібна головка СІР з безліччю форсунок.

Миючий розчин «Біомой» (від ДР 1.2.1) подається насосом під тиском на головку СІР, яка, обертаючись з високою швидкістю, видаляє забруднення з внутрішньої поверхні обладнання. При цьому розчин миючого засобу циркулює по замкнутому контуру між установкою СІР і ферментером [23]. Процес миття триває близько 30 хв.

ДР 1.4.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування обладнання проводять з метою змиву залишків миючих розчинів з поверхні обладнання для підготовки до подальшої стерилізації. Установка СІР (СІР-1) проводить ополіскування обладнання водою питною зі збірника (З-2) при температурі 20–25°C, яка також циркулює по замкнутому контуру. При цьому безперервно контролюється електропровідність води, яка повертається з обладнання. Як тільки вона досягає заданого значення, установка СІР автоматично відключається [23].

ТП 2. Лізис клітин

ТП 2.1. Лізис клітин за допомогою гомогенізатора високого тиску

Культуральна рідина з ферментеру відцентровим насосом подається в збірник культуральної рідини об'ємом 0,4 м³ (Р-1).

Зі збірника (Р-1) за допомогою відцентрового насоса (Н-2) подається на гомогенізатор високого тиску (ГВТ-3), де відбувається лізис клітин для полегшення відділення біомаси.

ТП 3. Відділення біомаси

ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини

Після гомогенізатора високого тиску (ГВТ-3) відцентровим насосом (Н-4) культуральна рідина подається у центрифугу безперервної дії зі шнековим вивантаженням осаду (Ц-5), де здійснюється центрифугування при 6000 об/хв, тривалість центрифугування становить 10 хв.

Супернатант, що утворився після закінчення процесу центрифугування, за допомогою відцентрового насоса (Н-6) подається у випарний апарат (В-7) для подальшого процесу очищення.

Вивантаження біомаси здійснюється автоматично шнеком. Біомаса подається на знешкодження відходів (ЗВ 11.1).

ТП 4. Упарювання ракіцидіну

ТП 4.1. Упарювання ракіцидіну

Концентрат після центрифугування (від ТП 3.1) подають у реактор-змішувач об'ємом 0,4 м³ (Р-8), у якому здійснюється випарювання ракіцидіну до в'язкої консистенції.

Після випарювання супернатант за допомогою відцентрового насоса (Н-6) подається на ультрафільтраційну установку (УФ-11), де відбувається процес ультрафільтрації.

ТП 5. Ультрафільтрація супернатанту від високомолекулярних частин

ТП 5.1. Ультрафільтрація ракіцидіну від високомолекулярних та низькомолекулярних частинок

Ультрафільтрація супернатанту (від ТП 4.1) здійснюється на ультрафільтраційній установці (УФ-11) для концентрування супернатанту та очищення розчину ракіцидіну.

Супернатант зі збірника (З-7) за допомогою відцентрового насоса (Н-8) через фільтр попередньої очистки (Ф-10) подається на фільтраційний модуль (ФМ-9) де протягом 35 хв при температурі 25 °С здійснюється ультрафільтрація на мембранах з діаметром пор 2 нм. Промивання мембран здійснюють водою питною.

Після ультрафільтрації концентрат ракіцидіну за допомогою відцентрового насосу (Н-12) подається назад в ультрафільтраційну установку для очистки від низькомолекулярних часток, але із іншим діаметром пор 0,005 мікрон.

Після повторної ультрафільтрації супернатант за допомогою насоса (Н-12) подається збірник (Р-14) для подальшої очистки на хроматограф.

Пермеат відводиться по центральній трубі і передається на знешкодження відходів (ЗВ 11.2).

ТП 6. Хроматографія ракіцидіну

ТП 6.1. Очищення ракіцидіну за допомогою хроматографії

Після ультрафільтрації концентрат ракіцидіну подається у хроматограф (ХР-17) для подальшої очистки та освітлення розчину.

Після освітлення супернатант за допомогою відцентрового насоса (Н-18) подається на уставку (В-26), де відбувається процес сушіння.

ТП 7 Кристалізація

ТП 7.1 Кристалізація ракіцидіну

Процес кристалізації відбуватиметься на кристалізаторі з примусовою циркуляцією (Кр-26) . Після хроматографії рідина через відцентровий насос (Н-18) по трубопроводі прямує до установки на кристалізацію з примусовою кристалізацією.

Суспензія з посудини кристалізатора циркулюють по методу витіснювальний руху рідини через теплообмінник і знову повертається в посудину кристалізатора, де її перенасичення знімають шляхом осадження матеріалу на кристалах, присутніх в суспензії. Випарений розчинник подається в вакуумну систему, де він конденсується і видаляється.

Кристалізація відбувається при пониженні температури до 6-8оС протягом 5 год після цього кристали пропускають через нутч-фільтр.

Після кристалізації ракіцидін за допомогою відцентрового насоса (Н-25) подається на сушильну установку (С-27), де відбувається процес сушіння ракіцидину.

ТП 8. Сушіння

ТП 8.1. Сушіння ракіцидину

Після кристалізації розчин ракіцидину (від ТП 7.1) подається на установку (С-27), де відбувається сушіння ракіцидину у вакуум випарній установці.

Після сушіння ракіцидін прямує до установки на для подрібнення (Кр-28).

ТП 9. Подрібнення ракіцидину

ТП 9.1. Подрібнення ракіцидину на циліндричній дробарці

Подрібнення ракіцидину здійснюється на циліндричній дробарці (Др-28).

Висушений ракіцидін із піддонів (від ТП 8.1) завантажується безпосередньо в бункер, де сировина потрапляє в камеру подрібнення, обертаючись зі швидкістю 2800 об/хв., молотки розбивають сировину об стінки, подрібнена сировина проходить через сітку обраної фракції. Збір подрібненої сировини відбувається в фільтр-рукав.

Подрібнення здійснюють до заданого діаметру часток 25-75 мкм протягом 30 хв.

Після подрібнення ракіцидін відправляють на просіювальну установку (Пр-29)

ТП 10. Просіювання ракіцидину

ТП 10.1. Просіювання ракіцидину

Подрібнений ракіцидін (від ТП 9.1) завантажується у просіювальну машину (Пр-29), де проходить через ряд сит з діаметром отворів 25, 50 і 75 мкм.

Просіювання здійснюється протягом 30 хв.

Фракції розміром менше 75 мкм йдуть на подальше пакування.

Після просіювання сухий порошок інозину прямує на пакувальну установку (ПМВ-37)

ЗВ 11. Знешкодження відходів

ЗВ 11.1. Знешкодження твердих відходів

Утилізацію твердих відходів найкраще здійснювати або аеробним, або анаеробним біологічним методом, за допомогою яких відбувається не тільки

утилізація відходів, а й утворюються цінні продукти (біогаз), покращуються властивості ґрунту.

Перетворення біомаси у вторинний енергоносіє відбувається за допомогою мікроорганізмів. При анаеробному бродінні біомаси під впливом різних груп бактерій відбувається утворення біогазу, який складається в основному з метану (55-70%) і вуглекислого газу (25-35%) [37].

Аеробне перетворення біомаси (компостування) відбувається на повітрі, тепло, яке звільняється при цьому, можна використовувати в теплових насосах або як низькотемпературне тепло [37].

Компостні ряди з природною аерацією повинні мати трикутну в перетині форму, ширину 2,5 м, висоту 1,5 м і будь-яку довжину. У таких рядах матеріал можна кілька разів перемішати, а іноді він може і не вимагати перемішування, якщо структура матеріалу забезпечує нормальну аерацію, температура не піднімається вище 60°C [38].

ЗВ 11.2. Знешкодження рідких відходів

Схема очищення стічних вод включає наступні етапи:

1) Механічне очищення. Здійснюється відстоюванням або фільтрацією. В результаті механічного очищення кількість мінеральних забруднень знижується на 60-70%, а БСК - на 30%. Крім того, проведення даного етапу очищення дуже важливо для встановлення рівномірного руху стоків (їх усереднення), що дозволяє уникнути значних коливань об'єму стічних вод на наступному біологічному етапі [39].

2) Біологічне очищення – за допомогою біофільтрів. Принцип дії біофільтра полягає в наступному: водорозподільний пристрій забезпечує рівномірне зрошення стічною водою поверхні завантаження біофільтра, дренажний пристрій служить для видалення очищеної стічної води. Знизу подається постійний потік повітря для аерації.

При контакті стічної води з біоплівкою відбувається сорбція органічних забруднень поверхнею біоплівки. Під час паузи між зрошеннями сорбовані забруднення окиснюються, і відновлюється сорбційна активність біоплівки. У

біофільтрі відбувається безперервний приріст і відмирання біоплівки. Відмерла плівка виноситься проточною водою і осідає у вторинних відстійниках [38].

3) Дезінфекція стічних вод – відбувається остаточне знезараження стоків. Знезараження очищених стічних вод здійснюють за допомогою установок ультрафіолетового опромінення, або протягом 30 хвилин проводиться обробка хлором.

Але так як хлор є дуже токсичною хімічною речовиною і може представляти величезну небезпеку для навколишнього середовища, то доцільніше для знезараження стоків використовувати інші реагенти: дезавіт, гіпохлорит або здійснювати озонування [39].

РОЗДІЛ 12. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

12.1. Вибір форми випуску лікарського засобу

На сьогоднішній час препарати для лікування раку, випускаються у формі твердих желатинових капсул, таблетках і розчину для ін'єкцій. [54].

Так як ракіцидін є новим препаратом на світовому ринку потрібно визначитися із найкращою формою для їх введення та швидкого всмоктування.

Переваги та недоліки наведених лікарських форм [55] представлені у *табл. 12.1*.

Таблиця 12.1

Переваги та недоліки лікарських форм

Лікарська форма	Переваги	Недоліки
Тверді желатинові капсули	✓ легко проковтуються та швидко набухають; ✓ желатинові капсули є легкорозчинні та є проникними для травних соків ✓ лікувальна дія лікарської речовини проявляється швидко (в середньому через 4–5 хв). ✓ висока біодоступність; ✓ точність в дозування; ✓ гарний зовнішній вигляд; ✓ виготовлення капсул майже цілком механізоване та автоматизоване. ✓ шляхом введення до складу желатинових стінок допоміжних речовин або покриття спеціальними плівками вдається одержувати капсули з різною швидкістю вивільнення та локалізацією дії лікарської речовини; ✓ оболонка із желатину захищає лікарську форму від впливу повітря, світла, вологи, пилу, захищає від механічних зовнішніх впливів, коливань температури. ✓ уміщення в оболонку зручне для відпускання речовин, які мають неприємний смак, запах та колір, тому капсули дуже перспективні для застосування в педіатрії та геронтології;	○ желатинова маса є прекрасним середовищем для розвитку мікроорганізмів; ○ у желатинових капсулах можуть відпускатися тільки ті речовини, що не вступають у взаємодію із гліцерином та желатином і не розчиняють їх; ○ висока чутливість до вологи – гігроскопічність.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Терещук Д.О.			РОЗДІЛ 12. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ		Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								110	177
Керівник		Станікова О.В.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П							

Лікарська форма	Переваги	Недоліки
Ін'єкційні лікарські форми	✓ швидка дія і повна біологічна доступність лікарської речовини; ✓ точність і зручність дозування; ✓ можливість введення лікарської речовини хворому, що знаходиться в непритомному стані або, коли ліки не можна вводити через рот; ✓ відсутність впливу секретів ШКТ і ферментів печінки, що має місце при внутрішньому вживанні ліків; ✓ можливість створення великих запасів стерильних препаратів, що полегшує і прискорює їх відпускання.	○ при введенні рідин через ушкоджений покрив шкіри в кров легко можуть потрапити патогенні мікроорганізми; ○ разом з препаратом для ін'єкцій в організм може бути введене повітря, що викликає емболію судин або розлад серцевої діяльності; ○ навіть незначні кількості сторонніх домішок можуть викликати шкідливий вплив на організм хворого; ○ психоемоційний аспект, пов'язаний із хворобливістю ін'єкційного шляху введення; ○ введення стерильних ліків повинні здійснюватися тільки кваліфікованими фахівцями
Таблетки	✓ зручність застосування; ✓ точність дозування; ✓ можливість сполучати несумісні за фізикохімічними властивостями і терапевтичній дії лікарські речовини; ✓ можливість маскуванню неприємного запаху, смаку, кольору й здатності до забарвлення ✓ можливість повної механізації й автоматизації виробництва; гігієнічність і масовість виробництва; ✓ висока компактність; ✓ стійкість до впливу несприятливих механічних і кліматичних факторів; ✓ зручність транспортування, зберігання й відпускання, тривалий строк придатності.	○ Дія лікарських речовин може розвиватися відносно повільно. ○ Таблетки неможливо ввести хворому при блювоті, у непритомному стані. ○ При тривалому зберіганні деякі таблетки можуть цементуватися, що призводить до зміни часу розпадання. ○ До складу таблеток часто вводяться баластні речовини, що не мають терапевтичної цінності, які іноді викликають деякі побічні явища (наприклад, тальк подразнює слизові оболонки). ○ Не всі хворі, особливо діти, можуть вільно проковтнути таблетки

Таким чином, проаналізувавши наведені переваги та недоліки, можна зробити висновок, що ін'єкційні лікарські форми мають багато недоліків: при їх виробництві необхідний контроль на стерильність, апірогенність, також вони характеризуються складністю введення. Найголовнішим недоліком є те, що незначні кількості домішок можуть бути шкідливими для здоров'я. Таблетки, у порівнянні з

капсулами, мають повільнішу терапевтичну дію, можуть псуватися при зберіганні, містять більше баластних речовин та менш зручні для ковтання.

Отже, найкращою лікарською формою для виробництва ракіцидіну є тверді желатинові капсули, так як вони є менш небезпечними для організму, ніж ін'єкційні засоби, мають більш швидку терапевтичну дію, порівняно з таблетками, мають тривалий термін зберігання та стабільність при зберіганні.

Обґрунтування вибору первинної упаковки та підготовки первинної упаковки

Капсули найчастіше упаковують у блістерні упаковки, скляні або пластмасові флакони. Порівняння даних типів упаковки [55] наведено у *табл. 9.2*.

Таблиця 12.2

Порівняння типів первинної упаковки для капсул

Характеристика	Блістер	Флакон
Розміщення капсул у упаковці	Кожна капсула знаходиться у окремій комірці і відокремлена від інших	Всі капсули знаходяться разом у одному флаконі, і не відокремлені одна від одної
Компактність	У блістері можна помістити невелику кількість капсул (10-20)	У флаконі можна помістити велику кількість капсул (близько 100)
Зручність використання	Блістер легкий, його зручніше носити з собою	Скляні флакони незручно брати з собою, зважаючи на те, що він може розбитися
Зберігання і транспортування	Може пошкодитися під час зберігання і транспортування.	Найнадійніший варіант фасування, не боїться транспортування і зберігання в практично будь-яких умовах.

Отже, хоч блістер зручніший у використанні, доцільніше фасувати капсули ракіцидіну у пластикові флакони, оскільки в них капсули краще захищені від факторів зовнішнього середовища, а також флакони забезпечують більшу компактність, зважаючи на те, що на курс лікування необхідно 41 капсула.

На кожному фармацевтичному підприємстві повинні бути інструкції з процесу підготовки, використання і методів контролю якості застосовуваних видів тари, допоміжних пакувальних засобів і пакувальних матеріалів, виконання вимог яких гарантує необхідний рівень чистоти пакувальних матеріалів за механічним і мікробним забрудненням.

Процес упаковки складається з наступних технологічних стадій: стадії підготовки до процесу упаковки; упаковка лікарських засобів в споживчу тару (фасування капсул у флакони, закупорювання флаконів); упаковка лікарських засобів в картонну тару; упаковка в групову тару; упаковка в транспортну тару.

При отриманні партії тари і пакувальних матеріалів необхідна перевірка на відповідність специфікації, відсутність пошкоджень упаковки і її чистоту і наявність документів, що задовольняють якість тари і пакувальних матеріалів. Отримання кожної партії повинно бути зареєстровано на підприємстві-споживачі.

Тара, допоміжні пакувальні засоби і матеріали надходять у виробництво при їх відповідності вимогам нормативної документації і з дозволу служб контролю якості.

Тара, пакувальні матеріали, допоміжні пакувальні засоби з мікробним забрудненням, що перевищує встановлені норми, або наявністю механічної забрудненості повинні проходити додаткову обробку (мийку, стерилізацію і т.п.) відповідно до технологічної інструкції процесу обробки; методики проведення робіт (мийка, стерилізація і т.п.); інструкції по зберіганню і міжцехового транспортування стерильних або «чистих» таропакувальних засобів.

Для миття тари і укупорочних засобів повинна використовуватися вода питна або очищена.

Для останнього ополіскування тари і закупорювальних засобів для нестерильних лікарських засобів повинна використовуватися вода очищена.

При транспортуванні підготовлених тари, закупорювальних засобів з одного приміщення в інше повинні бути передбачені спеціальні пристрої або контейнери, що виключають можливість їх вторинного забруднення або змішування (наприклад - виробнича полімерна тара для фармацевтичного виробництва місткістю 18, 22, 24 і 28 л по ТУ 64-7-674).

Кожна одиниця упаковки повинна бути забезпечена етикеткою або текст етикетки повинен бути нанесений безпосередньо на упаковку.

Виготовлення етикеток та інших друкованих матеріалів має бути організовано таким чином, щоб уникнути можливість їх змішування. Етикетки, бандеролі та інші друковані матеріали для кожного найменування лікарського засобу повинні зберігатися окремо в закритих контейнерах в приміщеннях для зберігання. Їх видача може бути дозволена тільки при наявності відповідного письмового розпорядження.

Транспортування етикеток з приміщень для зберігання до ліній маркування та упаковки повинно бути організовано так, щоб гарантувати неможливість їх підробки і змішування з етикетками, призначеними для маркування інших лікарських засобів

Опис лікарського засобу згідно АНД

Препарат ракіцидіну у Анатомарно – терапевтичній системі класифікації (АТС) займає наступне місце

Фармакологічна група.

Код АТС.

L-Антинеопластичні та імуномодулюючі засоби

L01 L антинеопластичні засоби

L01B антиметаболітами

L01B C Структурні аналоги піримідину

L01B C03 Тегафур

Антинеопластичні засоби. Антиметаболіти. Аналоги піримідиніл. Код АТС L01B C03.

Характеристика кінцевої продукції виробництва. Ракіцидіну в капсулах.

Основні фізико-хімічні властивості: тверді желатинові капсули. капсула:

корпус: хіноліновий жовтий (Е 104), заліза оксид червоний (Е172), титану діоксид (Е 171), желатин;

кришечка: яскраво-червоний 4R (Е 124), хіноліновий жовтий (Е 104), титану діоксид (Е 171), желатин.. Вміст капсул - порошок білого кольору.

Склад: на 1 капсулу – 400 мг ракіцидіну.

Допоміжні речовини: допоміжні речовини: кислота стеаринова.

Одноосновна карбонова кислота аліфатичного ряду. Відповідає такій хімічній формулі $C_{18}H_{36}O_2$ або $CH_3(CH_2)_{16}COOH$. Є білою кристалічною речовиною, нерозчинною у воді і розчинною в діетиловому ефірі.

Форма випуску: Тверді желатинові капсули, що містять по 400 мг ракіцидіну.

Фармакологічні властивості. Ракіцидини - це 15-членні депсипептиди, що складаються з трьох амінокислот та 3-гідроксигірних кислот. Ракіцидин містить рідкісну і незвичну амінокислоту, 4-аміно-2,4-пентадієнову кислоту, яка міститься лише у вторинних метаболітах актиноміцетів. На додаток до ракіцидинів, на сьогодні повідомляється лише про два типи циклічних пептидів, BE43547 та вінілміцин, що містять цю незвичайну амінокислоту.

Ракіцидин є відомим представником невеликого класу макроциклічних природних продуктів ліпидепсипептиду, які містять електрофільну функціональність 4-амідо-2,4-пентадієноату (APD). Ракіцидин виявляє селективну інгібуючу активність щодо гіпоксичних ракових клітин, а також стійких до іматинібу клітин хронічного мієлолейкозу (ХМЛ). Гіпоксія є загальною рисою багатьох пухлин і сприяє їх прогресуванню. Гіпоксичні клітини пухлини не тільки беруть участь у терапевтичній стійкості до хіміо- та променевої терапії, але також мають значення для ангіогенезу пухлини. Ракіцидин був приблизно в 17,5 разів більш цитотоксичним за гіпоксичних, ніж за нормоксичних умов.

Фармакокінетика. Вивчення фармакокінетичних параметрів ракіцидіну не проводилося.

Показання

Рак товстої і прямої кишки, шлунка, молочної залози, рак шийки матки, шкірні лімфоми.

Протипоказання

- ✓ Підвищена чутливість до компонентів препарату
- ✓ термінальна стадія хвороби;
- ✓ гострі профузні кровотечі
- ✓ важкі функціональні порушення печінки та / або нирок;
- ✓ лейкопенія (менше $3 \times 10^9 / л$), тромбоцитопенія (менше $100 \times 10^9 / л$) і анемія (рівень гемоглобіну менше 30 од.).

Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодій Спосіб застосування та дози. 1 тиждень приймати по 1 таблетці, 2 тиждень без прийому, 3 тиждень – прийом, четвертий перерва. На початку наступного місяця зробити діагностику. Та визначити подальший прийом ліків. Курс лікування становить 3 місяці. [8].

Побічна дія. Не виключено виникнення реакцій гіперчутливості на складові препарату [9].

Термін придатності

4 роки.

Не застосовувати після закінчення терміну придатності.

Умови зберігання

Зберігати в оригінальній упаковці для захисту від світла.

Зберігати при температурі не вище 25 ° С.

Зберігати в недоступному для дітей місці.

Упаковка

По 100 капсул у контейнері; по 1 контейнеру в коробці з картону.

Категорія відпуску

За рецептом.

СПЕЦИФІКАЦІЯ

на ракіцидін в капсулах

Таблиця 12.3

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	тверді желатинові капсули. капсула: корпус: хіноліновий жовтий (Е 104), заліза оксид червоний (Е172), титану діоксид (Е 171), без ушкоджень і видимих повітряних і механічних включень. Вміст капсул – порошок білого кольору білого кольору, мало розчинні у воді, розчинні в спирті і ефірі, без запаху.	За п.1, візуально
Ідентифікація	УФ- спектроскопія.	За п. 2.
Супровідні домішки	Забарвлення розчину ракіцидіну не має бути інтенсивнішим за забарвлення розчину еталонів.	За п. 3, ДФУ 2.4
Важкі метали	Не більше 0,001%	За п. 4, ДФУ 2.4.8
рН	Від 6,0 до 7,0	За п. 5, ДФУ, 2.2.3
Розчинення	Кількість ракіцидіну, що перейшов у розчин з кожної капсули через 45 хв, має бути від 0,3 до 0,460 г.	За п.6, ДФУ 2.9.3
Розпадання	Всі 6 капсул повинні розпастися за 30 хв	За п.7, ДФУ 2.9.1
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3,0 %.	За п. 8, ДФУ, 2.2.32
Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів уграмі. Відсутність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	За п. 9, ДФУ, 2.6.12,N, 2.6.13; N; 5.1.4, N (категорія 3 А)

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Однорідність маси	Не більше двох індивідуальних мас можуть відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує 7,5%. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилитися від середньої маси на величину, що перевищує 15%.	За п. 10, ДФУ, 2.9.5
Кількісне визначення	Вміст ракіцидіну в одній капсулі з дозуванням 0,4 г має бути від 0,340 до 0,460 г.	За п. 11, ДФУ, 2.5.33, 2.9.6
Зберігання	У сухому захищеному від світла місці, при температурі не вище 20 °С.	
Термін придатності	4 роки.	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. тверді желатинові капсули, корпус: хіноліновий жовтий (E 104), заліза оксид червоний (E172), титану діоксид (E 171), желатин без ушкоджень і видимих повітряних і механічних включень. Вміст капсул - кристали ракіцидіну білого кольору, мало розчинні у воді, розчинні в спирті і ефірі, без запаху [51].

2. Ідентифікація

Ідентифікацію здійснювали за допомогою спектроскопії. Оптичні обертання вимірювали з використанням поляриметра JASCO DIP-3000 (JASCO, Токіо, Японія). УФ-спектр реєстрували на спектрофотометрі Hitachi U-3210 (Hitachi, Ібаракі, Японія). ІК-спектр вимірювали на PerkinElmer Spectrum 100 (PerkinElmer, Waltham, MA, США). Спектри ЯМР отримували на спектрометрі Bruker AVANCE 400 або Bruker AVANCE 500 (Bruker, Бремен, Німеччина) в діметилсульфоксиде- d_6 , використовуючи сигнали протонів залишкового розчинника (δ H 2, 49) і атомів вуглецю (δ H 39, 8) в якості внутрішнього стандарту. HRESITOFMS були записані на фокусі Bruker microTOF.

Визначення супровідних домішок

Визначення домішок проводять згідно ДФУ п. 2.4 [51].

Визначають вміст домішок такі, як солі амонію, магнію, арсену, кальцію, лужноземельних металів, феруму, фосфатів, фторидів, хлоридів, цинку.

Солі амонію

0,1 г вмісту капсули розчиняють в 14 мл води, поступово підлужнюють розведеним розчином натрію гідроксиду і доливають об'єм розчину водою до 15 мл. Додають 0,3 мл розчину калію тетраїодмеркурату лужного.

Як еталон використовується розчин, одержаний додаванням до 10 мл еталонного розчину амонію (1 ppm NH_4) 5 мл води та 0,3 мл розчину калію тетраїодмеркурату лужного. Пробірки закривають. Після 5 хв жовте забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Арсен

Прилад для визначення складається з конічної колби місткістю 100 мл, закритої скляною притертою пробкою, крізь яку проходить скляна трубка завдовжки 200 мм

із внутрішнім діаметром 5 мм. Нижня частина трубки витягнута до внутрішнього діаметра 1.0 мм, на відстані 15 мм від кінчика трубки розташований бічний отвір діаметром від 2 мм до 3 мм. Трубка поміщена таким чином, щоб бічний отвір знаходився мінімум на 3 мм нижче нижньої поверхні пробки. Верхній кінець трубки повинен мати цілком плоску притерту поверхню, розашовану під прямим кутом до осі трубки. Друга скляна трубка завдовжки 30 мм з таким самим внутрішнім діаметром і такою самою плоскою притертою поверхнею поміщається зверху першої трубки і щільно прикріплюється до неї двома пружинами.

Нижню трубку нещільно заповнюють 50-60 мг свинцево-ацетатної вати або поміщають невеликий ватний тампон і скручену трубочкою смужку свинцево-ацетатного паперу масою 50-60 мг. Між плоскими поверхнями трубок поміщають шматочок ртутно-бромідного паперу такого розміру, щоб закрити отвір трубки (15*15) мм.

0,1 г вмісту капсули поміщають у конічну колбу і розчиняють у 25 мл води. Додають 15 мл кислоти хлористоводневої, 0,1 мл розчину олова (II) хлориду, 5 мл розчину калію йодиду, залишають на 15 хв і потім додають 5 г цинку активованого. негайно сполучають дві частини приладу, колбу поміщають у водяну баню, температура якої підтримується такою, щоб забезпечити рівномірне виділення газу.

Паралельно за цих самих умов проводять дослід з еталоном, що складається з 1 мл еталонного розчину арсену (1 ppm As) і 24 мл води.

Не менш як через 2 год забарвлення ртутно-бромідного паперу, одержане в досліді з випробовуваним розчком, має бути не інтенсивнішим за забарвлення ртутно-бромідного паперу, одержаного в досліді з еталоном.

Кальцій

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 15 мл води.

До 0,2 мл еталонного розчину кальцію спиртового (100 ppm Ca) додають 1 мл розчину амонію оксалату. Через 1 хв додають суміш 1 мл кислоти оцтової розведеної і 15 мл розчину ракіцидіну у дистильованій воді, струшують.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи суміш 1 мл кислоти оцтової розведеної, 10 мл еталонного розчину кальцію водного (100 ppm Ca) і 5 мл води дистильованої.

Через 15 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Хлориди

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 15 мл води, додають 1 мл кислоти азотної розведеної і виливають суміш за один раз у пробірку, що містить 1 мл розчину срібла нітрату.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 15 мл випробовуваного розчину 10 мл еталонного розчину хлориду (5 ppm Cl) і 5 мл води. Пробірки поміщають у захищене від світла місце. Через 5 хв пробірки переглядають на чорному фоні горизонтально. Опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Фториди

0,1 г вмісту капсули, 0,1 г піску, промитого кислотою, і 20 мл суміші рівних об'ємів кислоти сірчаної і води поміщають у внутрішню пробірку приладу. Оболонку, заповнену тетрахлоретаном, нагрівають до температури кипіння 146 °С. Приєднують генератор водяної пари і відганяють вміст пробірки з перегрітою водяною парою, збираючи відгін у мірну колбу місткістю 100 мл, яка містить 0,3 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду і 0,1 мл розчину фенолфталеїну. Об'єм розчину в пробірці під час відгону має бути постійним (20 мл). Підтримують лужну реакцію вмісту мірної колби, якщо необхідно, додаючи краплями 0,1 М розчин натрію гідроксиду. Доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують (випробовуваний розчин).

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість лікарського засобу 5 мл еталонного розчину фториду (10 ppm F).

У циліндр із скляною притертою пробкою поміщають 20 мл випробовуваного розчину, в другий такий самий циліндр – 20 мл еталона, потім у кожний циліндр додають по 5 мл реактиву амінометилалізариндіюктової кислоти.

Через 20 хв синє забарвлення випробовуваного розчину, що зявилося замість первісного червоного, має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Магній

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 10 мл води, додають 0,1 г динатрію тетраборату. Визначають рН розчину і, якщо необхідно, доводять до рН 8,8-9,2, використовуючи кислоту хлористоводневу розведену або розчин натрію гідроксиду розведений. Розчин поміщають у ділильну лійку, струшують протягом 1 хв з двома порціями, по 5 мл кожна, розчину 1 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, залишають до розшарування і відкидають органічний шар. До водного шару додають 0,4 мл бутила міну і 0,1 мл триетаноламіну. Визначають рН розчину і, якщо необхідно, доводять до рН 10,5-11,5. Додають 4 мл розчину 1 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, струшують протягом 1 хв, залишають до розшарування, нижній шар відбирають і використовують для випробування.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 10 мл розчину випробовуваної речовини суміш 1 мл еталонного розчину магнію (10 ppm Mg) та 9 мл води.

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивніше за забарвлення еталона.

Магній і лужноземельні метали

До 200 мл води додають 0,1 г гідроксиламіну гідрохлориду, 10 мл аміачного буферного розчину рН 10,0, 1 мл 0,1 М розчину цинку сульфату і близько 15 мг індикаторного суміші протравного чорного. Нагрівають до температури близько 40 °С. Одержаний розчин титрують 0,01 М розчином натрію едетату до переходу забарвлення розчину від фіолетового до синього. До одержаного розчину додають 0,1 г вмісту капсули, розчиненого в 100 мл води. Якщо забарвлення розчину стає фіолетовим, знову титрують до переходу забарвлення розчину до синього.

Об'єм 0,01 М розчину натрію едетату, витрачений на друге титрування, не має перевищувати об'єм титранту, зазначений в окремій статті.

Залізо

0,1 г вмісту капсули розчиняють у 10 мл води і перемішують. Додають 2 мл розчину 200 г/л кислоти лимонної і 0,1 мл кислоти тіогліколевої. Перемішують, підлужують розчином аміаку, доводять об'єм розчину водою до 20 мл.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи 10 мл еталонного розчину заліза. Через 5 хв рожеве забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталону.

Сульфати

До 1,5 мл еталонного розчину сульфату (10 ppm SO₄) додають 1 мл розчину 250 г/л барію хлориду. Струшують і залишають на 1 хв, потім додають 15 мл випробовуваного розчину (0,1 г вмісту капсули розчиняють у 15 мл води дистильованої) та 0,5 мл оцтової кислоти.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість випробовуваного розчину 15 мл еталонного розчину сульфату. Через 5 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Фосфати

До 100 мл приготованого і, якщо необхідно, нейтралізованого розчину вмісту капсули додають 4 мл сульфомолібденового реактиву. Струшують і додають 0,1 мл розчину олова хлориду.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 100 мл розчину випробовуваної речовини суміш 2 мл еталонного розчину фосфату і 98 мл води. Через 10 хв порівнюють забарвлення 20 мл кожного розчину.

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Калій

До 10 мл розчину лікарського засобу додають 2 мл свіжоприготовленого розчину 10 г/л натрію тетрафенілборату.

Паралельно за цих самих умов готують еталон, використовуючи замість 10 мл розчину випробовуваної речовини суміш 5 мл еталонного розчину калію і 5 мл води.

Забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона.

Алюміній

Розчин випробовуваної речовини поміщають у ділильну лійку, струшують з двома порціями, по 20 мл кожна, розчину 5 г/л гідроксихіноліну у хлороформі, потім з 10 мл цього самого розчину. Хлороформні шари відділяють і збирають у

мірну колбу місткістю 50,0 мл. Доводять об'єм розчину хлороформом до позначки і перемішують.

Еталон готують аналогічно.

Холостий розчин готують аналогічно.

Вимірюють інтенсивність флуоресценції випробовуваного розчину етанолу і холостого розчину, використовуючи збуджувач випромінювання за довжини хвилі 392 нм і вторинним за довжини хвилі 518 нм, або монохроматор, установлений на пропускання цієї довжини хвилі.

Флуоресценція випробовуваного розчину не має перевищувати флуоресценцію еталона.

Цинк

До 10 мл розчину випробовуваної речовини додають 2 мл розчину кислоти хлористоводневої і 0,2 мл розчину калію фероціаніду.

Паралельно готують еталон з використанням замість випробовуваного розчину 10 мл еталонного розчину цинк-іона (5 ppm Zn), який готують шляхом розведення водою у 1000 разів еталонного розчину цинку (5 мг/мл Zn).

Через 10 хв опалесценція випробовуваного розчину не має перевищувати опалесценцію еталона.

Важкі метали

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.4.8. [51]

Випробовуваний розчин. 0,1 г вмісту капсул розчиняють у 12 мл води.

Розчин порівняння (еталон). Змішують 10 мл еталонного розчину свинцю (1 ppm) Р, і 2 мл водного розчину випробовуваного лікарського засобу.

Холостий розчин. Змішують 10 мл води Р і 2 мл зазначеного водного розчину випробовуваного лікарського засобу.

До кожного розчину додають 2 мл буферного розчину (рН 3.5) Р. Перемішують і додають 1.2 мл тіоацетамідного реактиву Р, негайно перемішують. Через 2 хв розчини тестують. Придатність системи: розчин порівняння повинен мати світло-коричневе забарвлення при порівнянні з холостим розчином.

Результат: коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не більш інтенсивним за забарвлення розчину порівняння, що свідчить про наявність важких

металів у кількості не більше 0,001%. Якщо результат випробування складно оцінити, розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (номінальний розмір пір 0.45 мкм). Тиск на поршень шприца має бути помірним і постійним для забезпечення повільного і рівномірного фільтрування. Порівнюють плями на фільтрах, одержані для різних розчинів.

pH. (ДФУ 2.2.3) [12]

Випробовуваний розчин: 1 г вмісту капсул розчиняють у 9 мл води дистильованої. Потенціометричне визначення рН випробовуваного розчину проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий – електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С. рН має становити від 5,5 до 7,0 [7].

Розчинення (ДФУ 2.9.3) [12]

900 мл води Р (± 1 %) поміщають у посудину. Збирають прилад з кошиком, нагрівають воду до температури (37 ± 0.5) °С і видаляють термометр.

1 капсулу поміщають у прилад, уникаючи утворення бульбашок повітря на поверхні капсули. Починають обертання перемішуючого елементу із швидкістю 100 об/хв.

Відбір проб проводять через 45 хв з області посередині між поверхнею середовища розчинення і верхньою частиною кошика, що обертається. У ході випробування посудину закривають і контролюють температуру води. Аналіз проби проводять, використовуючи метод кількісного визначення (п. 8). Повторюють випробування із 5 іншими капсулами.

Кількість ракіцидіну, що перейшов у розчин з кожної капсули через 45 хв, має бути не менше 75% і не більше 115%, від зазначеного у розділі «Склад», тобто кількість ракіцидіну розчині має складати від 0,3 до 0,460 г.

Розпадання (ДФУ 2.9.1)

Випробування на розпадання дозволяє визначити, чи розпадаються капсули в межах визначеного часу, якщо вони поміщені в рідке середовище в експериментальних умовах.

Головна частина обладнання складається з жорсткого кошика із сітчастим дном-підставкою (кошик), яка підтримує шість циліндричних скляних трубочок, які підтримуються у вертикальному положенні двома пластмасовими дисками з 6 рівномірно розміщеними отворами. До нижньої частини диску прикріплена проволочна сітка із нержавіючої сталі з розміром отворів 2 мм.

У кожену з шести трубок поміщають одну капсулу, і якщо зазначено, поміщають диск. Опускають кошик у посудину з водою. Температура води має становити від 35 °С до 39 °С.

Вмикають прилад, по закінченні 30 хв кошик виймають і досліджують стан капсул.

Вважають, що зразки розпалися, якщо на сітці:

- а) немає залишку;
- в) є залишок, який складається з м'якої маси, що не має відчутно твердого ядра, котре не змочується;
- с) є лише фрагменти оболонки на сітці, або, якщо були використані диски, фрагменти оболонки, які прилипли до нижньої поверхні диска.

Препарат витримав випробування, якщо всі капсули розпалися.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32) [12].

0,2 г вмісту капсул поміщають у попередньо висушений зважений бюкс, сушать при температурі 105 °С протягом 1 год, зважують, за різницею визначають втрати в масі при висушуванні. Втрати в масі мають складати не більше 3,0 %.

Мікробіологічна чистота.

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.6.12, 2.6.13; N; 5.1.4, N (категорія 3 А) [12].

Визначення мікробіологічної чистоти здійснюють методом висіву на чашки Петрі. Висів можна здійснювати глибинним або поверхневим способом.

Відбирають середню пробу лікарського засобу, яка складається з рівних разових проб (по 0,1 г), взятих з 10 різних капсул.

Готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. Далі готують ще 5 десятикратних серійних розведень, використовуючи той самий розчинник.

Метод глибинного висівання (ДФУ п. 2.6.12): у кожен чашку Петрі вносять 1 мл останнього розведення і 15-20 мл розплавленого густого поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Температура середовища має становити не більше 45°C. Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°C до 35°C для бактерій та від 20°C до 25°C для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Метод поверхневого висівання: 0,1 мл останнього розведення розподіляють по поверхні поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°C до 35°C для бактерій та від 20°C до 25°C для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Лікарський препарат має відповідати таким вимогам щодо мікробіологічної чистоти:

- Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів - не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі або мілілітрі;

- Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 г або 1 мл;

- Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г або 1 мл;

- Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г або 1 мл.

Також проводять випробування на окремі види мікроорганізмів.

Родина *Enterobacteriaceae*

Спочатку готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, далі переносять у 100 мл поживного середовища № 3 (середовище збагачене для бактерій род. *Enterobacteriaceae*), гомогенізують і інкубують при температурі 35-

37°C впродовж 18-48 год. Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашки Петрі з густими поживними середовищами №4 (агар Ендо) і №5 (вісмутсульфітний агар). Посіви інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Наявність на середовищах характерного росту грамнегативних паличок, вказує на забруднення лікарського засобу бактеріями родини *Enterobacteriaceae* та деякими іншими грамнегативними бактеріями:

- середовище № 4: круглі малинові з металевим блиском або без нього колонії; рожеві, безбарвні, блискучі опуклі колонії діаметром від 2 мм до 4 мм;
- середовище № 5: чорні з металевим блиском колонії, ділянки середовища під якими забарвлені в чорний колір; зеленувато-бурі, ясно-зелені, бурі колонії.

Для ідентифікації бактерій род. *Enterobacteriaceae* підозрілі колонії, кожену окремо, пересівають на середовище № 1 (МПА), скошене в пробірках, і інкубують при температурі від 35 до 37 °C протягом 18-24 год. Після закінчення періоду інкубації підтверджують чистоту кожної культури і проводять тест на наявність цитохромоксидази. Культури, що дали негативну реакцію на цитохромоксидазу, пересівають, кожену окремо, у дві пробірки з рідким живильним середовищем № 6 (для визначення ферментації глюкози) і одну пробірку з рідким середовищем №7 (для визначення відновлення нітратів у нітрити). Після висівання в одну із двох пробірок із середовищем № 6 вносять близько 0.5 мл стерильного вазелінового масла. Усі посіви інкубують при температурі від 35 ° до 37 °C протягом 18-24 год. У випадку зміни кольору середовища № 6 із червоного на жовтий і, як правило, наявності газоутворення в пробірках з вазеліновим маслом і без нього роблять висновок про ферментацію глюкози. Про наявність нітриту на середовищі № 7 судять із появи червоного забарвлення при внесенні у середовище реактива Грісса. Лікарський засіб витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грамнегативних неспороутворюючих паличок, що дають негативну оксидазну реакцію, ферментують глюкозу з утворенням кислоти (або кислоти і газу) і відновлюють нітрати у нітрити.

Тест на наявність цитохромоксидази. Смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на цитохромоксидазу і наносять скляною паличкою чисту добову культуру випробовуваних бактерій, що виростили на середовищі № 1. Синє забарвлення, що з'являється через 2-5 хв, свідчить про позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

Staphylococcus aureus

Спочатку готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, переносять у 100 мл рідкого середовища №8 (для вирощування *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*), гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-48 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №10 (для ідентифікації *Staphylococcus aureus*) і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст золотаво-жовтих колоній (рис. 9.4), оточених жовтими зонами (що свідчить про ферментацію маніту), указує на можливість забруднення лікарського засобу *S. aureus*.

У цьому випадку роблять пересівання підозрілих колоній, кожної окремо, у пробірки з скошеним густим середовищем № 1 і інкубують при температурі від 35 °С до 37 °С протягом 18-24 год. Колонії, що виростили на середовищі № 1, мікроскопують і при виявленні у мазках тільки грампозитивних коків, розташованих гронами, проводять тест на плазмокоагулазу. Лікарський засіб витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грампозитивних коків, що ферментують маніт і дають позитивну реакцію плазмокоагуляції.

Тест на плазмокоагулазу (реакція плазмокоагуляції). Кров, узятую стерильним шприцом із серця кролика, поміщають у 5 % стерильний розчин натрію цитрату, відбирають плазму, розводять у співвідношенні 1:5 стерильним розчином 9 г/л натрію хлориду і розливають по 0.5 мл у стерильні пробірки. У кожену пробірку поміщають 1 петлю чистої добової культури стафілокока, що виростила на середовищі № 1, і інкубують при температур від 30 ° до 35 °С 4-6 год. Якщо протягом цього

часу не спостерігається згортання плазми, реакція плазмокоагуляції вважаються негативною.

Pseudomonas aeruginosa

Спочатку готують розведення лікарського засобу 1:10. 1 г лікарського засобу розчиняють у 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. 10 мл розведення лікарського засобу вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-48 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №9 (для виявлення пігменту піоціаніну) і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст зеленуватих, як правило, флуоресціюючих колоній, блакитних в ультрафіолетовому світлі (що свідчить про наявність пігменту піоціаніну), указує на можливість забруднення лікарського засобу *P. aeruginosa*. У цьому випадку роблять пересівання підозрілих колоній, кожної окремо, в пробірки із скошеним густим середовищем № 1 й інкубують при температурі від 35 ° до 37 °C протягом 18-24 год. Колонії, що вирости на середовищі № 1, мікроскопують, при виявленні у мазках тільки грамнегативних паличок, проводять тест на цитохромоксидазу. Лікарський засіб витримує випробування, якщо на середовищах не виявлений ріст грамнегативних паличок, що утворюють синьо-зелений пігмент піоціанін і дають позитивну реакцію на цитохромоксидазу.

Однорідність маси (ДФУ 2.9.5) [12].

Відбирають 20 капсул за статистично обґрунтованою схемою. Зважують нерозпаковану капсулу. Потім розпаковують капсулу в такий спосіб, щоб не було втрачено будь-якої частини оболонки, і видаляють якомога повніше її вміст. Потім зважують оболонку. За різницею зважувань розраховують масу вмісту капсули. Повторюють процедуру з іншими 19 капсулами. Далі розраховують середню масу. Препарат витримує випробування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує 7,5%. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси на величину, що перевищує 15%.

Кількісне визначення [12].

Визначають вміст ракіцидіну у капсулах відповідно до вимог, зазначеними в ДФУ 1.1. Відбирають 10 капсул за статистично обґрунтованою схемою.

Кількісне визначення ракіцидіну у капсулах проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Розпаковують капсулу в такий спосіб, щоб не було втрачено її вмісту, і видаляють якомога повніше її вміст. 0,1 г (точне зважування) вмісту капсули розчиняють у 10 мл води, розбавляють 1,0 н НСІ у співвідношенні 1:1 і витримують при температурі 37 °С і 200 об/хв протягом години для забезпечення повного розчинення ракіцидіну. Далі суміш розбавляють в межах норм калібрування 0,1 н НСІ, перемішують і центрифугують при 13200 об/хв протягом 10 хв.

Концентрацію ракіцидіну у розчині визначають методом ВЕРХ на колонці Agilent серії 1100. Елюювання здійснюють лінійним градієнтом 0,1% трифтороцтової кислоти (ТФО) та ацетонітрилу. Здійснюють елюцію сумішшю 95% водного розчину ТФО і 5% ацетонітрилу протягом перших 3 хв, далі концентрацію ацеонітрилу лінійно збільшують до 70% з 3 до 10 хвилини. Детектування здійснюється УФ-детектором (Agilent Eclipse +C18) при довжині хвилі 220 нм [1].

Повторюють аналіз для 9 інших капсул.

Лікарський засіб витримує випробування (ДФУ 2.9.6.), якщо вміст не більше ніж в одній капсулі виходить за межі 85-115 % і в жодній капсулі не виходить за межі 75—125 % від середнього вмісту лікарського засобу. Лікарський засіб не витримує випробування, якщо вміст більше ніж у трьох одиницях виходить за межі 85—115 % від середнього вмісту або якщо хоча б в одній одиниці виходить за межі 75—125 % від середнього вмісту. Якщо вміст у двох або трьох одиницях лікарського засобу виходить за межі 85—115 %, але знаходиться у межах 75—125 %, визначають вміст у кожній з 20 додаткових капсул. Лікарський засіб витримує випробування, якщо середній вміст не більш ніж у трьох з проаналізованих капсул виходить за межі 85—115 % і в жодній одиниці не виходить за межі 75—125 % від середнього вмісту.

Отже, вміст ракіцидіну у капсулі повинен не більше ніж в одній капсулі виходити за межі 85-115 % і в жодній капсулі не виходити за межі 75—125 % від

кількості, зазначеної в розділі "Склад". Кожна капсула з дозуванням 0,4 г повинна містити від 0,340 до 0,460 г ракіцидіну.

Розрахунок річної потужності та кількості серій на рік

Річна потужність біосинтезу ракіцидіну складає 24 кг (24000 г).

Вміст ракіцидіну в 1 капсулі дорівнює 400 мг (0,4 г). Отже, на рік необхідно виготовити $24000/0,4=60000$ капсул.

Продуктивність капсулонаповнювальної машини складає 5000 капсул на годину. Прийmemo, що час роботи машини 6 годин. Тому за один цикл наповнюється $5000*6=40000$ капсул. В 1 флакон фасується 42 капсул, тоді кількість флаконів на 1 серію складає 952.

Отже, кількість серій на рік складає $60000/120000=2$ серії.

Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Однією із важливіших вимог до виробництва якісної продукції є забезпечення якості препаратів за рахунок виконання всіх принципів та правил GMP.

Для виробництва капсул необхідно створити приміщення класу чистоти D, що є необхідною умовою для отримання стабільного препарату та його тривалого терміну придатності та для захисту продукту від мікроорганізмів.

Приміщення для виробництва та контролю якості лікарських засобів:

- повинні бути досить просторими та обладнані так, щоб звести до мінімуму ризик змішування різних лікарських засобів та їх компонентів, перехресне забруднення, пропуск однієї стадії у процесі виготовлення готових лікарських засобів та контролю їх якості;

- повинні використовуватися лише за призначенням;

- повинні мати гладкі внутрішні поверхні (підлоги, стіни, двері, стелі) із мінімальною кількістю виступаючих частин та ніш, а також повинні бути непроникні для інших рідин і легко доступними для миття та обробки різними дезінфікуючими засобами. Матеріали, які застосовуються для обробки виробничих приміщень, повинні легко митися, а також бути негорючими та стійкими до дії дезінфікуючих засобів;

- освітлювальні елементи, вентиляційні отвори, трубопроводи і т.д. повинні бути спроектовані та розташовані таким чином, щоб їх можна було легко мити та

обробляти дезінфікуючими засобами. Для того щоб провести технічне обслуговування доступ до них повинно проводитися, по можливості, поза виробничими приміщеннями;

- можуть піддаватися дії УФ-опроміненню для знезараження повітря за допомогою переносних чи стаціонарних випромінювачах (у присутності та у відсутності людей);

- повинні міститися у бездоганній чистоті, обов'язково повинно відбуватися щоденне прибирання і генеральне прибирання та періодичний ремонт згідно із відповідними письмовими інструкціями. В цих приміщеннях повинно регулярно проводити контроль за санітарно-гігієнічним станом під час роботи та у стані спокою, для того щоб гарантувати відповідність контрольованих параметрів нормам, встановлені у відповідних інструкціях підприємства;

- повинні містити необхідну для ведення виробничого процесу кількість обладнання та меблів;

- повинні мати температурний режим, освітлення, вентиляцію і вологість повітря, що не роблять непрямого чи прямого негативного впливу на якість вже готових продуктів під час виробничого процесу, а також для функціонування обладнання і здоров'я персоналу;

- повинні мати локальне устаткування, яке видаляє пил у місцях її утворення (під час відбору проб, змішування, зважування і т.п.).

Приміщення для процесу пакування лікарських засобів повинні:

- бути просторими, для того щоб можна було правильно організувати всі технологічні операції та не загрозовувати проходи для переміщення матеріалів;

- мати обладнання, щоб було розташоване таким чином, щоб усунути небезпеку змішування продуктів, а особливо на різних етапах пакування лікарських засобів та пакувальних матеріалів;

- мати температурний режим, освітлення, вологість повітря та вентиляцію, що не мають шкідливого впливу на якість готового продукту під час упаковки та на функціонування обладнання.

Приміщення для зберігання (склади) повинні:

- бути просторими для здійснення розтарування і забезпечення упорядкованого та роздільного зберігання вихідної сировини, напівпродуктів, допоміжних, пакувальних та маркувальних матеріалів, готових лікарських засобів, які знаходяться в карантині, дозволених до реалізації;

- забезпечувати надійний захист від розкрадання та випадкового чи зловмисного забруднення або зараження;

- бути сухими, чистими та мати необхідні освітлення, температуру, вентиляцію та вологість повітря;

- відповідати чинним правилам зберігання і поводження із легкозаймистими і вибуховими продуктами виробництва, токсичними та наркотичними речовинам.

Підготовка персоналу та одягу

На підприємстві повинна бути необхідна кількість персоналу, які мають відповідну освіту та здатні виконувати виробничі операції чи операції із контролю якості, що є однією із умов створення та підтримування в належному рівні системи забезпечення якості.

В посадових інструкціях підприємства повинно бути відображені всі виробничі завдання (права та обов'язки) всіх співробітників, у тому числі керівного персоналу, та області їх відповідальності.

Кожен співробітник підприємства повинен бути ознайомлений із основними положеннями GMP, які безпосередньо відносяться до його виробничої діяльності. На початку та протягом подальшої роботи кожен співробітник, який знаходиться на підприємстві повинен пройти курс навчання основам GMP, які включає в себе необхідні знання із гігієни.

Під час прийняття на роботу персонал повинен пройти підготовку за фахом, а також ознайомлення із правилами GMP. На підприємстві повинна зберігатися документація, що містить відомості про проходження навчання кожним співробітником протягом всього часу його перебуванні на підприємстві.

Персонал, який не пройшов спеціальну підготовку, не слід допускати до виробничих приміщень. Особливу увагу потрібно приділятися підготовці персоналу, чкі працюють в "чистих" приміщеннях. Персонал повинен володіти знаннями та

досвідом, необхідними для виробництва стерильних лікарських засобів, у тому числі знаннями із гігієни і основ мікробіології.

При прийнятті на роботу персонал повинен пройти повне медичне обстеження та регулярні медичні огляди. Персонал, який зайнятий у процесі виробництва ЛЗ, повинен строго дотримуватися інструкції, які регламентують про стан здоров'я та вимоги особистої гігієни.

Персонал заборонено торкатися руками до вихідної сировини, матеріалів первинної упаковки, допоміжних матеріалів, напівпродуктів та, окрім того, до деяких частин обладнання, якщо це не передбачено чинною технологічною документацією.

Забороняється приймати їжу, палити, пити та зберігати їжу, курильні матеріали та особисті ліки у виробничих приміщеннях та на складах.

Персонал, який входить у виробничі приміщення, повинен бути одягнений у спеціальний одяг. В приміщеннях класу чистоти D слід використовувати куртку та штани або халат, комбінезон; косинку або шапочку із бавовняних або лляних тканин; відповідне взуття чи бахіли, які одягаються зверху на взуття.

Роботу потрібно проводити у стерильних рукавичках із еластичних полімерів або гуми, а також у простерилизованому чи продезінфікованому взутті. Зверху на взуття повинні бути бахіли, які повністю закривають ступню. Нижня частина штанів потрібно заправити у бахіли, а рукави комбінезона відповідно в рукавички.

Жодна частина тіла чи нижня білизна не повинна бути відкрита. Одяг повинен бути зручним для роботи та приганяє по фігурі.

Руки та рукавички під час роботи слід регулярно обробляти дез. засобами

Підготовка дезінфікуючих засобів

Для зберігання миючих та дезінфікуючих засобів, інвентарю та матеріалів, які застосовуються при збиранні приміщень та обробці обладнання потрібно віділити відповідні приміщення.

Необхідне чергування дез. засобів для запобігання появи стійких форм мікроорганізмів. Бажано використовувати спороцидні дезінфікуючі засоби. Дезінфікуючі розчини повинні бути стерильні. Для того щоб уникнути зростання мікроорганізмів розчини слід зберігати обмежений час у заздалегідь вимитих

ємкостях. Для дезінфекції обладнання застосовують 6 і 3% -ві розчини перекису водню, який в концентрації 3% має фунгіцидну і бактерицидну дію, а у концентрації 6% - спороцидну. Окім того ще можна використовувати 76% розчин спирту етилового.

Отже, необхідно обрати дез. засоби для обробки поверхонь. Порівняльна таблиця дезінфікуючих засобів для обробки поверхонь приміщень наведено у *табл. 9.4.*

Таблиця 12.4

Порівняння дезінфікуючих засобів для поверхонь

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
Бланідас Актив	третинні аміни, ЧАС	Має миючі властивості (85%) Відсутність запаху, Термін зберігання Невикористаного розчину становить 16 діб.	Має бактерицидну, віруліцидну, туберкулоцидну, спороцидну, фунгіцидну дію	375 грн
Гуасепт	полігексаметиле нгуанідину гідрохлорид	миючі властивості, Відсутність запаху, Термін зберігання становить 60 діб.	Має бактерицидну, віруліцидну, туберкулоцидну, спороцидну, фунгіцидну дію	371 грн
Хлор Ліквід	гіпохлорит натрію	Миючі властивості, Термін придатності розчинів засобу – 3 добы	Має бактерицидну, віруліцидну, туберкулоцидну, спороцидну, фунгіцидну дію	62 грн
Амісепт	третинні аміни, ЧАС	Відсутність запаху. Має миючі властивості (85%). Термін зберігання невикористаного робочого розчину засобу становить 16 діб.	Має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну, спороцидну дію	195 грн

Отже, згідно отриманих даних обираємо Гуасепт і Бланідас Актив, оскільки вони мають широкий спектр дії, мають не високу вартість, а також хороші миючі властивості.

Дез. засоби необхідно чергувати кожні 3 місяці, для того щоб не розвивалася резистентність мікроорганізмів.

Для обробки рук персоналу можливе використання засобів, порівняння яких наведено в *табл. 13.4*.

Таблиця 13.4

Порівняння дезінфікуючих засобів для рук персоналу

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
АХД 2000 експрес	пропанол -1, пропанол -2, ЧАС	Містить комплексний догляд за шкірою, захищає шкіру рук від подразнень та сухості, зберігає природний водно-жировий баланс шкіри та еластичність.	Має віруліцидну, туберкулоцидну, фунгіцидну та бактерицидну активність.	180

Дез. засіб	Діюча речовина	Властивості	Спектр дії	Вартість за 1 л
Віпасепт	етанол 80%, молочна кислота	Пролонгована дія протягом 3-х годин. Відсутність подразнень та алергічних реакцій шкіри. Містить систему пом'якшення шкіри і захист. Забезпечує знежирення та очищення шкіри та сприяє ефективному прилипанню хірургічної плівки	Має туберкулоцидну, бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію	170 грн
Мікрасепт	пропанол -1, пропанол -2, ЧАС	Містить комплекс догляду за шкірою, захищає шкіру рук від сухості і подразнень, зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри	Має віруліцидну, туберкулоцидну, бактерицидну, фунгіцидну дію	258 грн
АХД 2000 ультра	етанол 75%	Виключені подразнення та алергічні реакції шкіри. Комплексний догляд за шкірою, захищає шкіру рук від сухості та подразнень, зберігає еластичність та природний водно-жировий баланс шкіри. Засіб має пролонговану дію протягом 3-х годин	Має віруліцидну, бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну активність	246 грн

Отже, доцільно використовувати засіб Віпасепт, оскільки його перевагами є невисока вартість та пролонгована дія (протягом 3 годин).

Підготовка вентиляційного повітря

Потенційним джерелом забруднення ЛЗ є повітря виробничих приміщень, а отже, підготовка вентиляційного повітря є однією найважливішою стадією.

Атмосферне повітря містить в своєму складі різні частинки органічного та неорганічного походження, мікроорганізми та вологу.

Очищене повітря, яке подається до виробничого приміщення класу чистоти D, проводиться по 3-х східчастій системі: попередньої, тонкої та надтонкої.

Виробничі приміщення повинні бути обладнані приладами для вимірювання температури, ефективності фільтрації та перепаду тиску на фільтрах та датчиком вологості.

Повітрозабірники припливної вентиляції потрібно розташовувати у місцях із максимальною чистотою повітря та з урахуванням напрямків панівних вітрів.

Система підготовки вентиляційного повітря повинна забезпечувати його чистоту у "чистих" приміщеннях відповідно до таблиці та підтримувати позитивний перепад тиску по відношенню до приміщень більш низького класу чистоти. Зовнішні та внутрішні поверхні фільтрокамер та повітропроводів вентиляційних установок "чистих" приміщень повинні бути покриті для їх обробки дезінфікуючими розчинами.

Очищення витяжного повітря потрібно здійснюватися за допомогою фільтрів тонкої очистки для захисту навколишнього середовища від можливих шкідливих викидів із виробничих приміщень.

Обов'язковим елементом підготовки повітря є центральний кондиціонер. До кондиціонера потрапляє повітря після попередньої очистки на фільтрі грубої очистки.

Для довшого терміну експлуатації фільтрів HEPA/ULPA використовується багатоступенева очистка на фільтрах грубої очистки типу EU4 в якості яких застосовують сухі коміркові фільтри, мішечні або ін.

Необхідною є умова наявності системи рециркуляції повітря, яка в свою чергу дозволяє суттєво знизити витрати на багатоступеневу очистку атмосферного повітря.

Повітря потрапляє до фільтра грубого очищення, далі до центрального кондиціонера, де піддається нагріванню, охолодженню та знову нагріванню, далі надходить до парозволожувача та через вентилятор до фільтра тонкого очищення, потім до вискоєфективного фільтра. Повітря надходить до чистих приміщень різних зон А, В, С, D, а вони у свою чергу забезпечені вискоєфективними фільтрами вже фінішного очищення [60].

Обґрунтування вибору підготовки води

Для миття матеріалів обладнання та первинної упаковки повинна використовуватися вода очищена.

Для приготування нестерильних ЛЗ, останнього ополіскування матеріалів первинної упаковки, поверхонь та обладнання, яке контактує із нестерильними ЛЗ і напівпродуктами, потрібно використовувати воду очищену.

На стадіях основного виробництва і для проведення ряду допоміжних робіт використовується вода очищена. Джерелом отримання води очищеної є вода питна.

Підготовка очищеної води здійснюється при застосуванні установки для пом'якшення води та установки зворотного осмосу.

На першій стадії вода проходить через пісочний фільтр, в якому відбувається очищення від механічних домішок, після цього вона потрапляє через вугільний фільтр, який дозволяє знизити концентрацію органічних речовин та хлору, далі вода направляється до установки пом'якшення води.

Пом'якшення – це процес видалення катіонів кальцію та магнію, які спричиняють жорсткість води. Залежно від складу вихідної води та вимог, пропонованих до технологічної води, пом'якшення роблять декількома способами: хімічним (реагентним), термічним та зворотньоосмотичним (мембранним).

Термічний метод заснований на зниженні розчинності діоксиду вуглецю при підвищенні температур, які приводить до зрушення вуглекислотної рівноваги та утворенню карбонату кальцію, який випадає в осад. Внаслідок високої енергоємності даний спосіб отримав широкого поширення.

З реагентних способів пом'якшення води найбільш відомий є вапняно-содовий. Пом'якшення води даним способом засновано на переведенні розчинних у ній кальцієвих солей карбонатної жорсткості $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ у присутності розрахункової кількості гашеного вапна (гідроксиду кальцію – $\text{Ca}(\text{OH})_2$) в нерозчинну сіль CaCO_3 . Незважаючи на високий результат знесолення, спосіб має недоліки: тривалість процесу формування та осадження осаду, більші габарити технологічного устаткування і великі витрати реагентів,.

За використанням іонообмінного способу зниження жорсткості води здійснюється за допомогою деяких природних чи синтетичних з'єднань, практично нерозчинних у воді, обмінювати іони, які перебувають в їхньому складі, Na^+ чи H^+ на іони Mg^{2+} і Ca^{2+} , що в свою чергу спричиняють жорсткість води. Спосіб простий, компактний, дешевий, за рахунок чого і є найпоширенішим [63].

Для кінцевої очистки води застосовується кілька методів – це зворотній осмос, іонний обмін і електродеіонізація.

Іонний обмін – це один із ефективних методів видалення із води аніонів і катіонів. Це одна із важливих стадій очищення, що використовується як етап для попереднього очищення та і для отримання води очищеної. Іонний обмін полягає у використанні іонітів, тобто сігчастих полімерів з різним ступенем зшивання, гелевою мікро- чи макропористою структури, ковалентно пов'язаних із іоногенними групами.

Переваги:

- малі капітальні витрати,
- простота,
- відсутність принципових обмежень для досягнення більшої продуктивності.

Проте цей метод має ряд суттєвих недоліків:

- Наявність хімічно агресивних реагентів;
- Смоли вимагають частої регенерації для відновлення обмінної здатності та підвищеної уваги з боку персоналу;
- Велика кількість хімічно агресивних стічних вод після проведення регенерації фільтрів та ін.

Електродеіонізація – це різновид іонного обміну. Система електродеіонізації використовує комбінацію смол, вибірково проникних мембран та електричного заряду для кращого забезпечення безперервного потоку та безперервної регенерації.

Технологія електродеіонізації має ряд переваг:

- неенергоємним процесом;
- безперервна регенерація;
- Не потрібна заміна смоли (смола не забракне);
- Не зупиняється виробництво води через виснаження смоли;
- Досить низькі витрати в обслуговуванні;
- Не потребує хімічних реагентів для регенерації.

Зворотний осмос дає найтонший рівень фільтрації. Зворотньоосмотична мембрана має дію бар'єра для розчинних солей, органічних та неорганічних

молекул, а також для пірогенних речовин та мікроорганізмів. У середньому вміст розчинених речовин після зворотного осмосу знижується до 1-9%, органічні речовини - до 5%, колоїдні частинки, пірогени, мікроорганізми відсутні. Вода, яка отримується даним способом, містить мінімальну кількість органічного вуглецю.

Переваги зворотного осмосу:

- простота та незалежність від вмісту солі вихідної води,
- низькі енергетичні витрати та невисокі витрати на сервіс та технічний догляд,
- Система легко піддається мийці, очищенню і дезінфекції, не вимагає використання сильних хімічних реагентів та необхідності їх нейтралізації [63],
- виключна надійність методу, яке обумовлює високу якість демінералізованої води незалежно від сезонних коливань якості вихідної води, технологічних параметрів та «людського фактору»;
- висока економічна ефективність;
- скорочення виробничих площ, простота експлуатації та автоматизація технологічного процесу [62].

Згідно переліченого обираємо для остаточної очистки води зворотній осмос, оскільки він дозволяє максимально очистити воду та є досить простим, економічно вигідним і надійним методом.

Воду очищену зберігають у закритих ємкостях, виготовлених із матеріалів, що відповідають нормативним документам та захищають від чужорідних частинок і мікробіологічних забруднень. Ємкість для зберігання повинна бути оснащена сорочкою для подачі пару і холодної води, мішалкою, системою термостатування, системою зрошування для забезпечення безперервного змочування всієї внутрішньої поверхні ємкості, манометром, гідрофобним повітряним фільтром, підливною мембраною та системою регулювання рівня.

Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

На першому етапі технологічного процесу виробництва капсул готується порошок, який містить діючу і допоміжні речовини, для дальнішого наповнення капсул.

Для цього субстанцію ракіцидіну і допоміжні речовини попередньо зважені та просіяні змішують в реакторі-змішувачі.

На другому етапі відбувається наповнення капсул. Порожні тверді капсули наповнюють в спеціальних наповнювальних автоматах. Наповнення твердих желатинових капсул відбувається у п'ять операцій:

1. спочатку здійснюється орієнтування порожніх капсул;
2. розкриття порожніх капсул;
3. наповнення корпусу капсули (відбувається шляхом подання наповнювача із бункера в дозувальний канал, в якому порошок надходить в корпус капсули;
4. з'єднання та закриття тіла і кришечки капсули і викидання наповнених капсул до накопичувального контейнера;
5. глянсування капсул та їх запаювання;

Оскільки потужність виробництва капсул невелика, обираємо капсулонаповнювальну машину середньої продуктивності ZANASI 26 (5000 капсул за годину) фірми IMA (Італія) (рис. 1.1).



Рис. 12.1. Капсулонаповнювальна машина ZANASI 26 фірми IMA (Італія)

Під час третього етапу здійснюється фасування капсул в пластикові флакони у спецізованій автоматичній лінії для фасування капсул фірми КоролевФармТех (Росія)

Дана установка включає:

- автомат для орієнтації флаконів,
- автомат для фасування капсул у флакони CVC 1220 (рис. 9.2), (забезпечує 100% гарантовану точність підрахунку капсул у кожний флакон.

Установка виготовлена із нержавіючої сталі з поліруванням зварних швів, які виключають можливість забруднення продукту. Оснащена системою 3-D зчитування параметрів, що має захист від запилення, система автоматичного відбраковування неправильно заповнених флаконів. Продуктивність становить до 60 флаконів за хвилину.

Далі лінія має:

1. конвеєрні ваги,
2. автомат для вкладання вати в флакон,
3. автомат для закупорювання флаконів,
4. автомат для запайки мембрани,
5. автомат для нанесення етикетки на флакон.



Рис. 12.2. Автомат для фасування капсул у флакони CVC 1220

На четвертому етапі відбувається пакування флаконів до вторинної упаковки – картонні пачки.

Пакування відбувається за допомогою картонажної машини CVC 1600, що формує пачку, поміщає у картонну пачку флакон та інструкцію, наносить на клапан картонної пачки маркування (фармкод, дату), закриває заповнену картонну пачку. Дана машина має такі переваги:

1. компактна,
2. має високу точність упаковки флакона в картонну пачку.

Продуктивність машини 20-60 упаковок за хвилину.

На п'ятому етапі відбувається пакування пачок в групову тару.

Обираємо машину для упаковки пачок до картонних коробок Romaco Promatic PAK 100 (Італія) [1]. Для кожного робочого процесу (транспортування згрупованих коробок, групування коробок та подальша упаковка в короб) є відведена окрема робоча зона, яка дозволяє відстежувати критичні операції та, відповідно, знижувати час простоїв машини до мінімуму. Оператор вручну формує та встановлює короб у машину. Групування та укладання коробок виконується у автоматичному режимі. Продуктивність – 5 коробок на хвилину. Також перевагами даної машини є:

- Невисока вартість;
- Компактність;
- Проста конструкція і управління;
- Відповідність європейським директивам з безпеки.

РОЗДІЛ 13. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена у *табл. 13.1.*

Таблиця 13.1

Специфікація обладнання ділянки виготовлення лікарського препарату ракіцидіну в капсулах

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПМ-1	Пральна машина	1	Машина марки ЛО-30 (Росія), завантажувальна маса сухої білизни 40 кг. Геометричний об'єм внутрішнього барабана 300 куб.дм.
СП-2	Сушильна шафа	1	Завантажувальна маса сухої білизни 30 кг. Геометричний об'єм внутрішнього барабана 514 куб.дм. Продуктивність-75 кг/год.
С-3	Стіл для пакування одягу	1	Габаритні розміри, мм: 400×1000×700.
СТ-4	Стерилізатор паровий для стерилізації інвентарю та одягу	1	Виробник: Тюменський завод медобладнання та інструментів (Росія), об'єм стерилізаційної камери становить 560 куб.дм. Робочий тиск не більше 0,2 Мпа. Температура-132°С. Спосіб управління-автоматичний.
Ст-5	Стелаж для зберігання і транспортування білизни	1	Встановлений на 4 поворотних колесах, стелаж фірми "Blicke"(Німеччина), завантажувальна маса сухої білизни 3х35кг та три просторі полиці.
Д-6, Д-9, Д-12	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор виробництва НВП "Техноваги". Точність зважування якого 0,1%
Р-7	Реактор змішувач для приготування 3% розчину перекису водню	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 160 л, обладнаний перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)

НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Терешук Л.О.			РОЗДІЛ 13. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				Літ.	Арк.	Акрушів	
Консульт.										147	177	
Керівник		Станікова О.В.										
Н. Контр.												
Зав. каф.		Стабніков В.П										
					Кафедра БТМ							

1	2	3	4
Н-8, Н-11, Н-14, Н- 15, Н-26, Н-28	Насос Відцентровий	6	Відцентровий насос фірми ЕВАРА (Японія) серії Ebara 2CDX 200-30, продуктивністю становить 12,6 м ³ /год
Р-10	Реактор змішувач для приготування 6% розчину перекису водню	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 160 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна).
Р-13	Реактор змішувач для приготування 76% розчину етанолу	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 160 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
Ф-16	Патронний фільтр	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 0,45 мкм
З-17	Збірник води	1	Збірник водопровідної води, об'ємом 8 м ³
Н-18	Нагнітаючий насос	1	Автоматична установка водопостачання Гідроджет JP5/24, продуктивність якого 3м ³ /год., максимальний тиск-6 бар, максимальна температура 40 °С
Ф-19	Патронний фільтр	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 0,40 мкм
Ф-20	Пісочний фільтр	1	Фільтруючий матеріал – кварцевий пісок розміром-2,0-3,0 мм
Ф-21	Вугільний фільтр.	1	Фільтр BWT AKF 25/13 (Німеччина), фільтруючий матеріал – гранульоване активоване вугілля, робоча температура: 4-30 ° С, робочий тиск: 3-7 атм, продуктивність: 2,3 м ³ /год
П-22	Установка для пом'якшення води	1	Пом'якшувач води іонообмінний катіонітний, продуктивність становить 1,8-2,0 м ³ /год.
Ф-23	Патронний фільтр	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор до 10 мкм
Н-24	Висконапірний насос		Плунжерний насос, тип 1057Al-Bz, тиск до 55-60 бар

1	2	3	4
ЗО-25	Установка зворотного осмосу	1	Установка CU:RO фірми Eurowater, продуктивність 2 м ³ /год очищеної води
З-27	Збірник очищеної води	1	Збірник очищеної води об'ємом 4 м ³
Ф-29	Фільтр патронний.	1	Фільтр фірми „Укрфільтр”, розмір пор 0,22 мкм
О-30	Опромінювач води ультрафіолетовий.	1	Опромінювач ECOSOFT UV E-720 фірми Alterair (Україна), потужність 45 Вт, напруга -220 В, максимальний робочий тиск до 8 бар, продуктивність 2,721 л / год, максимальна температура води-40 ° С
ПЗ-31	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник серії OBR 200 M-2K, виробник Bahçivan (Туреччина), продуктивність 1800 м ³ /год. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-32, Ф- 38	Фільтр грубої очистки	2	Фільтр фірми Alterair (Україна), фільтруючий матеріал - пінополіуретан, ефективність очищення 65-90% частинок розміром 5 мкм, перепад тиску 250 Па
В-33, В-37	Вентилятор	2	Вентилятор Soler&Palau (Іспанія) СМТ/2-180/075, потужність становить 0,75 кВт, продуктивність-1800 м ³ /год, частота обертання 2800 об/хв.
К-34	Кондиціонер	1	Кондиціонер DAIKIN FDXS35F/RXS35L3 (Чехія), потужність становить 1,15 Вт, напруга відповідно 220-240 В, холодоагент-R410A, теплопродуктивність-4 кВт

1	2	3	4
Ф-35	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр фірми Alterair (Україна), перепад тиску 450 Па, ефективність очищення до 70% частинок розміром 1 мкм, фільтруючим матеріалом є скловолокно
Ф-36	Фільтр НЕРА	1	Фільтр фірми New Filter (Україна), ефективність очищення до 99.95%, фільтруючим матеріалом є склопапір
З-39, З-45	Збірник для ракіцидіну	2	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 100 л, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
З-40, З-46	Збірник для допоміжних речовин	2	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 100 л, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
В-41, В-42	Ваги	2	Вантажопідйомність 150 кг. Межі зважування становлять 10-150 кг. Ціна ділення 50 г. Погрішність $\pm 0,15$ кг.
С-43	Вібросито	1	Виробник завод "Прогресс". Споживана потужність якого 2,2 кВт. Продуктивність 700 кг/год. Сито №11 чи №20. Діаметр отвору-(1,1 $\pm$ 0,07)мм, (2 $\pm$ 0,07)мм. Загрузка відбувається вручну вигрузка- самоплином
С-44	Вібросито	1	Виробник завод "Прогресс". Споживана потужність 2,2 кВт. Продуктивність-700 кг/год. Сито №32 чи №38. Діаметр отвору-(0,2 $\pm$ 0,03)мм, (0,195 $\pm$ 0,021)мм. Загрузка здійснюється вручну вигрузка- самоплином
Р-47	Реактор змішувач для отримання порошку для наповнення	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
З-48	Збірник порошку для наповнення	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)

1	2	3	4
КН-49	Установка для наповненню желатинових капсул	1	Капсулонаповнювальна машина ZANASI 26 фірми IMA (Італія), продуктивність становить 25000 капсул за годину. Загрузка здійснюється вручну вигризка - самоплином.
З-50	Збірник для наповнених капсул	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
З-51, З-53, З-55	Збірник для некондиційних капсул	3	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 40 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
С-51	Сито для обезпилювання капсул	1	Діаметр отвору сита (3,0 + 0,08) мм (5,0+0,09) мм. Завантаження та вивантаження вручну.
З-52	Збірник для знепиленних капсул	1	Реактор із нержавіючої сталі об'ємом 250 л, оснащений перемішувальним пристроєм, виробник «Стройторгсервис» (Україна)
ФЛ-54	Лінія фасовки капсул у флакони	1	Автоматична лінія для фасування капсул фірми КоролевФармТех (Росія). Лінія включає: автомат для орієнтації флаконів, конвеєрні ваги, автомат для фасування капсул у флакони, автомат для закупорювання флаконів, автомат для вкладання вати у флакон, автомат для запайки мембрани і автомат для нанесення етикетки на флакон. Продуктивність – до 60 флаконів за хвилину.
ПМ-56	Машина для упаковки флаконів в коробки	1	Машина SVC 1600 (Росія), продуктивність якого 20-60 упаковок за хвилину.

1	2	3	4
ПМ-57	Машина для пакування у групову упаковку	1	Машина Romaco Promatic PAK 100 (Італія), продуктивність – 5 коробок на хвилину.
РМ-58	Машина для різки некондиційних капсул	1	Продуктивність 60 кг/год. Загрузка-вручну вигрузка- самоплином, виробник Україна.

РОЗДІЛ 14. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема отримання ракіцидіну у капсулах включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва: підготовка персоналу, технологічного одягу, дез. засобів, приміщень та обладнання), підготовки вентиляційного повітря, підготовки води очищеної, підготовки сировини), технологічний процес (підготовка маси для наповнювання в капсули та наповнення капсул та стадії пакування, маркування, відвантаження (фасування капсул до флаконів, пакування флаконів до картонних пачок та пакування пачок до групової тари).

ДР 1. Підготовка персоналу до роботи

ДР 1.1. Навчання персоналу

При прийнятті на роботу персонал повинен пройти підготовку за фахом, включаючи ознайомлення із "Правилами організації виробництва і контролю якості лікарських засобів (GMP)" та інструкцією із дотриманням правил гігієни. Періодично персонал виконує технологічний інструктаж. Також навчання персоналу включає вивчення посадових інструкцій, правил внутрішнього розпорядку підприємства, вивчення вимог санітарії, правил особистої гігієни, заходів пожежної безпеки, правил охорони праці і техніки безпеки.

ДР 1.2. Перевірка знань персоналу

Після закінчення навчання робітники повинні пройти перевірку отриманих знань: по правилах GMP - у формі тестування; по знанням СОП - у формі співбесіди (теорія) і демонстрації практичних навичок на робочому місці (практика); по охороні праці і екології - у формі співбесіди.

ДР 1.3. Підготовка до роботи у чистих приміщеннях

У гардеробній верхнього одягу персонал знімає верхній одяг, головні убори, вуличне взуття і надягає перехідний одяг (халат, шапочку або косинку, тапочки), що використовують для переміщення персоналу поза виробничими зонами. Потім персонал направляється в умивальну, де миє руки.

НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Терешук Л.О.			РОЗДІЛ 14. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.								152	144
Керівник		Станікова О.В.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Зав. каф.		Стабніков В.П							

Далі персонал іде в гардероб технологічного одягу, де знімає перехідний одяг (халат, шапочку або косинку) і одягає технологічний одяг (халат або блузон і штани і шапочку або косинку) і в перехідних тапочках направляється до роздільного коврика. Працівники в технологічному одязі і перехідному взутті стають на половину роздільного коврика, ретельно витирають підошву тапочок об нього, знімають перехідне взуття і одягають технологічне взуття, стаючи нею на іншу половину роздільного коврика. Потім персонал направляється до умивальника, де миє і обробляє дезінфікуючими засобами руки. руки теплою водою до ліктів. Сушать руки за допомогою повітряної сушарки.

В якості дезінфікуючого засобу використовують «Віпасепт». Витрата дезінфікуючого засобу виходячи з розрахунку 9-10 мл на людину вдень. Антисептичну обробку рук проводять відповідно до вимог інструкції. Наливають на долоню з дозатора близько 5 мл антисептика, ретельно розподіляють його по внутрішній і зовнішній поверхні кисті, між пальцевими проміжками і навколо нігтевим простором рук і дають висохнути. Рукавички використовує персонал безпосередньо контактуючий з сировиною і не розфасованим продуктом. Дезобробку рук проводять через кожні 2-3 години, але не менш 3 разів в зміну.

Після того, як надітий весь комплект захисного спеціального одягу (*від ДР 2.6*), персонал обробляє руки антисептиком, надягає рукавички і входить у виробничі приміщення на ділянку виробництва капсул. При необхідності вийти з виробничого приміщення, персонал робить операції перевдягання у зворотному порядку, зводячи до мінімуму забруднення одягу. При повторному вході у виробниче приміщення, персонал проходить всі стадії обробки спочатку, з обов'язковою антисептичною обробкою рук.

Визначення мікробної контамінації рук персоналу проводить мікробіолог один раз в тиждень під час виробничого процесу, в кожному виробничому приміщенні, вибірково в декількох працівників і один раз в два тижні безпосередньо після обробки рук антисептиками. Контроль мікробної мікрофлори рук персоналу здійснюється за допомогою змивів тампонами. Після обробки рук антисептиками в змивах з рук не повинні міститися життєздатні мікроорганізми.

Під час виробничого процесу в змивах з рук (рукавичок) допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см² площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* та *P.aeruginosa*.

ДР 2. Підготовка технологічного одягу

ДР 2.1. Прання технологічного одягу

Прання технологічного одягу здійснюється в спеціально призначених для цього приміщеннях D класу чистоти. Прання проводять в пральній машині протягом 20-30 хвилин з моменту включення машини. На кожний кілограм одягу, що завантажуються, повинно припадати не менш 10 л розчину миючого засобу. Для прання слід використовувати синтетичні миючі засоби, що володіють низькими піноутворюючими властивостями. Концентрація розчину – 2 г/л, рекомендована температура прання 90°C.

ДР 2.2. Ополіскування технологічного одягу

Після закінчення прання одяг кілька разів ополіскують протягом 20-30 хвилин водою очищеною (від ДР 6.4) спочатку теплою, потім холодною.

ДР 2.3. Сушіння технологічного одягу

Після прання одяг струшують та по комплектах розвішують на плічки і поміщають в спеціальну шафу, в яку через фільтр тонкого очищення поступає тепле повітря при температурі 100°C протягом 120 хвилин.

ДР 2.4. Пакування технологічного одягу

Після закінчення сушки кожен комплект технологічного одягу загортають в два шари рослинного пергаменту. Після цього згортки поміщають в бікси або інші контейнери, що закриваються кришками, і передають на стерилізацію.

ДР 2.5. Стерилізація технологічного одягу

Стерилізацію технологічного одягу проводять в автоклавах при надлишковому тиску 0,11 МПа і температурі 132 °C протягом 45 хвилин. Після закінчення процесу стерилізації необхідно спустити пару, підсушити одяг і охолодити його стерильним повітрям.

ДР 2.6. Зберігання технологічного одягу

Пакети з одягом зберігають в окремому спеціально обладнаному чистому приміщенні із забезпеченням збереження упаковки у місці, що по класу чистоти перевищує приміщення, в якому одяг експлуатуватиметься при відносній вологості приміщення не більше 60%.

Мікробіологічний контроль одягу здійснюється вибірково у декількох робітників не рідше одного разу на тиждень. У змивах допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см² площі поверхні, при відсутності бактерій родини *Enterobacteriaceae*

ДР 3. Підготовка дезінфікуючих розчинів

ДР 3.1. Приготування розчину перекису водню 3% та 6%.

Для приготування 100 л 3 % розчину перекису водню у реактор-змішувач (Р-3) об'ємом 160 л, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) вносять 12 л 30% розчину перекису водню та додають 88 л води очищеної (від ДР 6.4) та вмикають перемішуючий пристрій.

Для приготування 100 л 6 % розчину перекису водню у реактор-змішувач (Р-3) об'ємом 160 л, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) вносять 24 л 30% розчину перекису водню та додають 76 л води очищеної (від ДР 6.4) та вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлений розчин перекису водню можна зберігати в герметично закритій скляній посудині в прохолодному місці не більше доби.

ДР 3.2. Приготування розчину етанолу 76%.

Для приготування 100 л спирту етилового 76 % у реактор-змішувач (Р-3) об'ємом 160 л, обладнаного перемішуючим пристроєм, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) вносять 79,2 л 96% етилового спирту, додають 20,8 л води очищеної (від ДР 6.4) та вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлений розчин спирту етилового 76% зберігають в герметично закритій скляній посудині в прохолодному місці не більше 5-6 діб.

ДР 3.3. Приготування робочого розчину «Гуасепт»

Для дезінфекції поверхонь необхідно приготувати 0,3% розчин «Гуасепт». У чисте емальоване відро об'ємом 10 л наливають 30 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 10 л водопровідної води. Зміна відра відбувається через кожні 10 м²

приміщення.

Розчин використовують для щоденної обробки стін, дверей, підлоги, зовнішніх) поверхонь технологічного обладнання, обробки виробничої зони і зони контролю якості. Приготовлений розчин можна зберігати у прохолодному місці протягом 60 діб.

ДР 3.4. Приготування робочого розчину «Бланідас Актив»

Для дезінфекції поверхонь необхідно приготувати 0,1% розчин «Бланідас Актив» КС. У чисте емальоване відро об'ємом 10 л додають 10 мл концентрату дезінфікуючого розчину та 10 л водопровідної води. Зміна відра відбувається через кожні 10 м² приміщення.

Розчин використовують для щоденної обробки стін, дверей, підлоги, зовнішніх поверхонь технологічного обладнання, обробки виробничої зони і зони контролю якості. Приготовлений розчин можна зберігати у прохолодному місці протягом 16 діб.

ДР 4. Підготовка виробничих приміщень

ДР 4.1. Щоденне прибирання

Щоденне очищення й дезінфекцію приміщень проводять безпосередньо по закінченню виробничого процесу, після кожної зміни. Збирають розсипані тверді інгредієнти, механічні забруднення за допомогою пилососа, витирають пролиті рідини. Відходи при фасовці і упаковці препарату (залишки друкованої продукції розривають, номери серій закреслюють фломастером). Весь викинутий матеріал використанню не підлягає.

Проводять вологе вбирання теплою водою із застосуванням робочого розчину «Гуасепт» (від ДР 3.3) або «Бланідас Актив» (від ДР 3.4), із розрахунком 100 мл/м², протираючи поролоновою губкою панелі, стіни, двері, ручки дверей, повітропроводи, опалювальні прилади і простір за ними, потім цим ж розчином миють підлогу. Обробку приміщень починають в точці, найбільш віддаленій від дверей.

Після використання матеріали для обробки протягом 2-3 годин знешкоджують замочуванням в розчині перексиду водню 6% (від ДР 3.1).

Після прибирання здійснюють мікробіологічний та хімічний контроль. Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами на поверхні приміщень не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

На поверхнях виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки миючих розчинів на поверхні приміщень.

ДР 4.2. Генеральне прибирання

Генеральну підготовку виробничих приміщень D класу чистоти слід проводити робочим розчином «Гуасепт» (від ДР 3.3) або «Бланідас Актив» (від ДР 3.4). Стіни, двері і інші поверхні приміщення слід протирати поролоновою губкою, рясно змоченою робочим розчином з розрахунку 100 мл/м², потім цим же розчином вимити підлогу.

Також проводиться очищення освітлювального оснащення, скляних поверхонь, віконних рам.

Після прибирання здійснюють мікробіологічний та хімічний контроль. Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами на поверхні приміщень не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

На поверхнях виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки миючих розчинів на поверхні приміщень.

ДР 5. Підготовка обладнання, інвентарю та трубопроводів

ДР 5.1. Миття обладнання та комунікацій

Перед початком технологічного процесу й після закінчення роботи або перед виготовленням кожної серії нового найменування препарату (щомісячно) апаратуру, устаткування, інвентар (змішувач, сушильна шафа, автомати для упаковки і ін.) звільняють від залишків продукту попередньої операції, очищають вручну за допомогою лопатки.

Після чого зовнішні частини устаткування, інвентар, розбірні деталі не дотичні із продуктом, миють серветками із тканини із забитими краями або паролоновими

губками, змоченими миючим 3% розчином перекису водню (від ДР 3.1), промивають гарячою водою питною з температурою 40-60°C. Матеріали і інвентар для обробки устаткування необхідно маркувати, зберігати в спеціальному приміщенні і використовувати строго за призначенням.

Потім обладнання промивають водою очищеною до одержання позитивного результату при контролі відмивання на відсутність миючих і дезінфікуючих засобів і слідів попереднього препарату. Після мийки внутрішні частини устаткування сушать стисненим повітрям.

ДР 5.2. Технічний огляд обладнання

Технічний огляд обладнання здійснюється технологом або майстром ділянки. При виявленні недоліків чи несправності обладнання проводиться його ремонт.

ДР 5.3. Дезінфекція обладнання та комунікацій

Внутрішні частини устаткування, розбірні деталі, які стикаються із продуктом, дезінфікують 76% розчином етилового спирту (від ДР 3.2). Після використання матеріали для обробки протягом 2-3 годин знешкоджують замочуванням в розчині перексиду водню 6% (від ДР 3.1).

Після дезінфекції здійснюють мікробіологічний та хімічний контроль. Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами змивах з обладнання не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

У процесі виробництва не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P.aeruginosa*; повинні бути відсутніми залишки дезінфікуючих розчинів на обладнанні.

ДР 6. Підготовка води очищеної

ДР 6.1. Подача води

Водопровідна вода через патронний фільтр (Ф-9) поступає в накопичувальний збірник (З-10). Оптимальна температура води, що подається на установку очищення води складає 25°C, для цього в збірник (З-10) добавляють гарячу воду.

ДР 6.2. Отримання води знесоленої

ДР 6.2.1. Очистка через пісочний фільтр

Питна вода (від ДР 6.1) із збірника (З-10) за допомогою насосу (Н-11) подається на пісочний фільтр (Ф-15), при цьому підтримується постійне значення тиску в лінії подачі води 3-4 бар. Пісочний фільтр затримує домішки розміром до 10 мкм.

ДР 6.2.2. Очистка через вугільний фільтр

Після пісочного фільтра вода (від ДР 6.2.1) поступає на вугільний фільтр (Ф-18). Фільтрація через вугільний патронний фільтр дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору.

ДР 6.2.3 Пом'якшення води

Вода (від ДР 6.2.2) подається на установку пом'якшення води (П-12). Вода після установки пом'якшення повинна мати жорсткість не більшу 0,3 мг-екв/дм³, інакше установку відключають на регенерацію.

ДР 6.2.4. Остаточна очистка води від механічних домішок

Пом'якшена вода (від ДР 6.2.3) поступає на патронний фільтр (Ф-22), який служить для остаточної очистки від механічних домішок перед насосом початкового тиску. Насос початкового тиску (Н-24) підвищує початковий тиск води перед високонапірним насосом (Н-24) до значення 3,5-4,0 бар.

ДР 6.3. Отримання води очищеної

ДР 6.3.1. Зворотньоосмотичне фільтрування

Високонапірний плунжерний насос (Н-2) підвищує тиск води (від ДР 6.2.4) до 30-65 бар, в результаті чого приблизно 30 % поданої води проштовхуються на сторону чистої води через мембрани модуля установки зворотного осмосу (ЗО-24). Іони солей та інші забруднення не можуть проникнути через мембрану і разом із залишком поданої води витісняються наступною порцією води, що надходить до модуля.

Концентрат через клапан при нормальній роботі установки направляється в каналізаційний колектор (до ЗВ 13.1). Для здійснення контролю очищеної води відбирають пробу через вентиль відбору проби. Значення електропровідності очищеної води повинно бути не більше за 8,5 мкС/см.

Якщо електропровідність очищеної води менша за 10 мкС/см, то очищена вода направляється в збірник очищеної води (З-25).

ДР 6.4. Розподіл води очищеної

Вода очищена (від ДР 6.3.1) із збірника (З-25) за допомогою насоса (Н-26) подається через фільтр (Ф-27) з розміром пор 0,2 мкм та бактерицидний опромінювач (О-28) в замкнутий циркуляційний контур, з якого надходить на виробництво.

ДР 7. Підготовка вентиляційного повітря

Очищення повітря, що подається у виробничі приміщення класу чистоти D, проводять по 3-х східчастих системі: попередньої, тонкої і надтонкої очистки.

ДР 7.1. Забір повітря

Повітря через повітрозбірник (ПЗ-) потрапляє на фільтри грубої очистки.

ДР 7.2. Грубе очищення повітря

Попереднє очищення вхідного повітря від пилу здійснюються в фільтрах грубої очистки (клас G3) (Ф-) через пінополіуретан з ефективністю очищення 65-90% частинок розміром 5 мкм.

ДР 7.3. Транспортування технологічного повітря

Після фільтрів (Ф-) попереднього очищення повітря надходить у систему вентиляції за рахунок вентилятора (В-).

ДР 7.4. Регуляція термодинамічних показників повітря

Повітря надходить у кондиціонер (К-), де воно охолоджується, з повітря конденсується волога, після чого додатково підігрівається до температури 30-35°C, вологість повітря має становити 60%.

ДР 7.5. Тонке очищення повітря

Далі повітря поступає на фільтри тонкого очищення, в якості яких використовують фільтри (Ф-) з скловолокном в якості фільтруючого матеріалу. Ефективність очищення становить 70% частинок розміром 1 мкм. В процесі експлуатації фільтри тонкого очищення повітря не піддаються обробці і згодом підлягають заміні на нові.

ДР 7.6. Надтонке очищення повітря

На останньому етапі повітря надходить на НЕРА-фільтри (Ф-10) з скло папером у якості фільтруючого матеріалу для видалення частинок розміром 0,3 мкм. Ефективність очищення 99,95%. Після даної стадії очистки повітря подається у приміщення класу D.

Проводиться мікробіологічний контроль очищеного повітря не рідше 1 разу на тиждень. Повинно бути не більше 200 КУО життєздатних мікроорганізмів на 1 м³ повітря.

ДР 8. Підготовка сировини

Сировина та допоміжні матеріали, які використовуються при виробництві ракіцидіну в капсулах, надходять зі складу заводу на візках або автокарах в первинній тарі постачальника з обов'язковою вказівкою статусу сировини та наявністю протоколу аналізу вхідного контролю. Отримана зі складу сировина зберігається в спеціально відведеній коморі в кількості необхідній для виробництва однієї серії.

ДР. 8.1. Зважування сировини

Субстанцію ракіцидіну зважують на вагах у збірнику (З-1). На вагах у збірнику (З-2) зважують кальцію стеарат, лактозу, крохмаль, мікрокристалічну целюлозу (МКЦ) та сорбіт.

ДР. 8.2. Просіювання сировини

Ракіцидін (від ДР 8.1) просіюють на просіювачі (С-) з ситом №11 або №20. Завантаження проводять вручну за допомогою совка, вивантаження здійснюється самоплином у збірник (З-9).

Допоміжні речовини (від ДР 8.1) просіюють на просіювачі (С-) з ситом №32 або №38. Завантаження проводять вручну за допомогою совка, вивантаження здійснюється самоплином у збірник (З-10).

ТП 9. Одержання маси для наповнення капсул

ТП 9.1. Змішування

Змішування здійснюється в реакторі-змішувачі (Р-12). Сировину (від ДР 8.2) завантажують із збірників (З-9, З-10) в реактор-змішувач (Р-12) за допомогою вакуумного завантаження та перемішують 3 хв.

ТП 10. Наповнення капсул, знепилювання і полірування

ТП 10.1. Наповнення капсул

Наповнення здійснюється на установці для наповнення капсул (КН-). Заповнюють порожніми капсулами бункери для капсул (порожні капсули додаються в міру використання). Заповнюють прийомний бункер для порошку за допомогою

вакуумного завантаження масою для наповнення капсул (від ТП 9.1). Наповнення капсул проводиться у автоматичному режимі при тиску стиснутого повітря – 6 бар (0,6 МПа), тиску вакууму – 0,02 бар (0,002 МПа). Наповнення твердих желатинових капсул здійснюється в п'ять операцій: спочатку здійснюється орієнтування порожніх капсул, потім розкриття порожніх капсул, наповнення корпусу капсули здійснюється шляхом подання наповнювача з бункера у дозувальний канал, з якого порошок надходить у корпус капсули. Після цього відбувається з'єднання і закриття тіла і кришечки капсули, далі капсули заклеюються підпавленою стрічкою желатину або полівінілового спирту. Далі йде відбракування порожніх капсул (легко відсмоктуються, якщо мають меншу масу).

Вивантаження наповнених капсул здійснюється стиснутим повітрям відразу на обезпилювач (Об-).

ТП 10.2. Знепилювання і полірування капсул

Обезпилювання і полірування капсул (від ТП 10.1) здійснюють на установці (Об-). Обезпилені капсули надходять у збірник (З-22).

ПМВ 11. Фасування капсул, пакування і маркування

ПМВ 11.1. Фасування капсул у флакони

Капсули (від ТП 10.2) із збірника (З-22) завантажують в бункер фасувального автомату (Фс-24) автоматичній лінії для фасування капсул (капсули додають в міру їх використання).

Капсули з бункера автоматично по багатоканальному конвеєру проходять через станцію розпізнавання, де відбувається відлік 90 капсул і їх фасування за допомогою погрузаємого сопла у флакон, що виключає можливість втрати продукту. Після цього флакони з капсулами переміщуються за допомогою транспортерної стрічки, а на їх місце надходять порожні.

Потім флакони з капсулами проходять по конвеєрним вагам, де перевіряється маса флаконів з капсулами. Система подає звуковий сигнал при виявленні відхилення у вазі, при цьому відбувається відбракування цих флаконів за допомогою пневматичної системи.

Далі за допомогою ватонабивного автомату здійснюється вкладання вати в флакон з капсулами, щоб капсули не стиралися в процесі транспортування, або зберігання.

Ватонабивний автомат використовує в якості сировини довгий рулон вати або бавовни, який поділяється на шматочки необхідного розміру і вставляється в флакон з капсулами в автоматичному режимі.

Після цього здійснюється закручування кришки за допомогою спеціального автомата. Кришка закручується за допомогою обертових роликів поступово, у міру проходження флакона по конвеєру.

Далі за допомогою системи індукційного запаювання мембрани відбувається герметичне запаювання горлечка флакону алюмінієвою мембраною, що гарантує справжність, стійкість продукту і захищає від зовнішніх факторів під час транспортування.

Для закупорювання мембраною флакон з попередньо закрученою кришкою по конвеєру надходить на автомат індукційного запаювання. Індукційна котушка випромінює високочастотне електромагнітне поле, алюмінієвий диск нагрівається і полімер, нанесений на цей диск, плавиться і припаюється до горлечка флакона.

Після цього флакони направляються на етикетировочну машину для маркування. Флакони з капсулами маркуються шляхом нанесення етикетки за допомогою етикетировочної машини.

На етикетці, виготовленій поліграфічним способом друку, попередньо вказують назву препарату, концентрацію, виробник, умови зберігання.

При проходженні стрічки з етикетками через друкарський пристрій на етикетку наносять номер серії та термін придатності.

При русі флаконів по транспортеру флакони затискуються направляючими і стеновими роликами, та на них приклеюється етикетка.

Після наклеювання етикеток флакони передаються на автомат для упаковки у картонні пачки.

Розфасовані у флакони капсули передають на операцію ПМВ 11.2.

Некондиційні капсули надходять у збірник (З-) на стадію ПВ 12.

ПМВ 11.2 Пакування флаконів у пачки.

Пакування флаконів з капсулами (*від ПМВ 11.1*) у вторинну упаковку – картонні пачки здійснюється на фасувально-пакувальній машині (ФП-28).

Пакування здійснюється за допомогою картонажної машини (ФП-), яка формує пачку, поміщає в картонну пачку інструкцію і флакон, наносить на клапан картонної пачки маркування (дату, фармкод), закриває заповнену картонну пачку.

На картонних пачках попередньо зазначається назва виробника, його товарний знак і адреса, назва препарату латинською і українською мовами, концентрація, умови зберігання, реєстраційний номер, штриховий код.

Упаковки передають на станцію ПМВ 11.3.

ПМВ 11.3. Пакування пачок у групову тару

На пачці та етикетці групової тари вказують назву заводу, його товарний знак, адресу назву препарату латинською, українською або латинською, українською та російською мовами, дозування, кількість капсул в упаковці, «Застосування за призначенням лікаря», «Зберігання в недоступному для дітей місці», умови зберігання, номер реєстрації, номер серії, термін придатності, штриховий код.

На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок. Пачки (*від ПМВ 11.2*) вкладають по 35 штук у коробки картонні на автоматі (ГП-). У кожную коробку вкласти талон «Пакувальник №» обклеїти стрічкою, що склеює. Під стрічку покласти етикетку затвердженого зразка.

Готова продукція з відповідним маркуванням знаходиться на піддонах або стелажах в приміщеннях карантинного збереження до отримання позитивного результату контролю готової продукції. Зберігається готова продукція на складі готової продукції у сухому захищеному від світла місці при температурі від 15°C до 25°C.

ПВ 12. Переробка відходів

Капсули некондиційні після стадії обезпилювання ТП 10.2 зі (З-21) та стадії ПМВ 11.1 надходять у машину для різки некондиційних капсул (МР-). В бункер даної машини капсули некондиційні завантажують за допомогою совка.

ЗВ 13. Знешкодження відходів

ЗВ 13.1. Знешкодження рідких відходів

Виробничі стічні води (від мийки приміщень, устаткування, інвентарю) (від ДР 2.1.1, 2.1.2, 2.5, 4.1, 4.2, 5.1, 6.2.3, 6.3.1, 7.4) по санітарно - хімічних показниках відповідають нормативним вимогам і можуть зливатися в міську каналізаційну мережу без попереднього очищення.

ЗВ 13.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи (пил лікарських засобів), які осідають в рукавних фільтрах систем місцевих відсмоктувань і вакуумних пилеприбирань збираються в спеціальні мішки і утилізуються. Збір і утилізація твердих відходів виробництва (упаковки, тари і т. д.) проводиться згідно діючим договорам на утилізацію відходів.

ЗВ 13.3. Очищення відрацьованого повітря.

Відпрацьоване повітря очищається від пилу та домішок в фільтрах (клас G3) через пінополіуретан з витравленими порами ефективністю очищення 65-90% частинок розміром 5 мкм.

РОЗДІЛ 15. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РАКІЦИДІНУ В КАПСУЛАХ

15.1 Контроль мікробіологічної чистоти рук та одягу персоналу, який працює у виробничих приміщеннях

Контроль ефективності обробки антисептиками рук персоналу проводять не рідше одного разу на місяць безпосередньо після їх обробки перед надяганням рукавичок, контроль мікробіологічної чистоти рук (рукавичок) під час виробничого процесу - не рідше одного разу на тиждень вибірково у декількох робітників. Контроль мікробіологічної чистоти одягу під час виробничого процесу проводять вибірково у декількох робітників не рідше одного разу на тиждень.

Використовують метод змивів тампонами. Випробування проводять у лабораторії, дотримуючись правил асептики. Кожний тампон ретельно виполіскують в пробірці, щомістить 10 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0.

З кожної пробірки, що містить змивну рідину, роблять посів по 1 мл в дві чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій і в дві з поживним середовищем для вирощування грибів, використовуючи один з наведених нижче методів, описаних в ДФУ (розділ 2.6.12) для випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів:

- метод глибинного висівання;
- метод двошарового висівання.

5 мл змивної рідини вносять у флакон з 50 мл рідкого поживного середовища N 3, описаного в ДФУ (розділ 2.6.13).

При проведенні випробування на наявність *S.aureus* і *P.aeruginosa* 5 мл змивної рідини вносять у 50 мл відповідних рідких поживних середовищ, описаних в ДФУ (розділ 2.6.13). Чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій інкубують при температурі 32.5 ± 2.5 °C, з поживним середовищем для вирощування грибів - при температурі 22.5 ± 2.5 °C протягом 5 діб, флакони з поживними середовищами N 3 і N 8 - при температурі 32.5 ± 2.5 °C протягом 48 год.

					НУХТ БТЕК 02.02.14 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата										
Розроб.		Терещук Д.О.			РОЗДІЛ 15. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РАКІЦИДІНУ В КАПСУЛАХ				Літ.		Арк.		Акрушів	
Консульт.											166		177	
Керівник		Станікова О.В.							167					
Н. Контр.									Кафедра БТМ					
Зав. каф.		Стабніков В.П.												

У разі наявності росту мікроорганізмів на контрольних поживних середовищах, партію поживного середовища вважають непридатною, а випробування, проведене з використанням цієї партії середовища - недійсним.

Облік результатів: Після закінчення інкубації для кожного змиву з однієї руки підраховують кількість колоній на всіх чашках Петрі з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення та, множачи його на 10, обчислюють кількість бактерій або грибів у змивах з однієї руки.

При наявності візуальних ознак росту у флаконах зживильним середовищем №3 проводять ідентифікацію бактерій родини *Enterobacteriaceae* по ДФУ (розділ 2.6.13).

При проведенні випробування на наявність *S.aureus* і *P.aeruginosa* ідентифікацію мікроорганізмів проводять, використовуючи методи, описані у ДФУ (розділ 2.6.13).

У змивах, взятих з одягу та рукавичок після термічної обробки, допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см² площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички, при відсутності бактерій родини *Enterobacteriaceae*. У змивах з рук (рукавичок) персоналу не допускається наявність *S.aureus* та *P.aeruginosa*. Результати випробувань реєструють.

Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь виробничих приміщень

Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь виробничих приміщень проводять не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфікуючими розчинами.

Випробування методом відбитків. Готують агарові пластини одним з наведених нижче способів:

- в чашки Петрі діаметром 100 мм по радіусам закладають 4 шматки марлі, стерилізують, потім заливають поживним середовищем. Після застигання середовища його розрізають на 4 сектори, дотримуючись правил асептики;
- заливають поживне середовище у поглиблення кришечки бакпечатки і дають застигнути;
- використовують готові агарові пластини.

Підготовлені матеріали вміщують у бікс. Перед передачею біксів з матеріалами у виробничі приміщення їх зовнішні поверхні обробляють спиртом етиловим (об'ємна частка 76 %).

Для виявлення росту бактерій використовують поживне середовище №1, для виявлення росту грибів - поживне середовище №2 для контролю мікробіологічної чистоти лікарських засобів, які описані в ДФУ (розділ 2.6.13).

Облік результатів: При випробуванні методом змивів для кожної контрольної точки підраховують кількість колоній в усіх чашках Петрі з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення і, множачи його на 10, обчислюють кількість бактерій та грибів у змивах із 100 см² площі поверхні.

При випробуванні методом відбитків для кожної контрольної точки підраховують число колоній на всіх агарових пластинах з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення і обчислюють число бактерій та грибів на 100см² площі поверхні по формулі:

$$X = \frac{100 \cdot x \cdot N}{S}$$

Де X - число колонієутворюючих мікроорганізмів на площі 100 см²; N - середнє арифметичне значення числа колоній мікроорганізмів; S - площа пластини (см²).

При проведенні випробування на наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa* ідентифікацію мікроорганізмів проводять використовуючи методи, що описані у ДФУ (розділ 2.6.13).

На поверхнях виробничих приміщень у процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Результати випробувань реєструють.

Контроль видалення миючих засобів з поверхні приміщень

Повноту видалення залишків мийних засобів на основі аніонних поверхнево-активних речовин з робочих поверхонь технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, внутрішньоцехової тари контролюють шляхом визначення вмісту залишкової кількості мийних засобів (за залишками аніонних поверхнево-активних речовин) в останній порції промивної води.

Наявність аніонних поверхнево-активних речовин у промивній воді визначають шляхом додавання до 50 см³ останньої порції промивної води 5 крапель 1 % розчину фенолфталеїну (при необхідності суміш нейтралізують 1 моль/дм³ розчином гідроокису натрію чи 0.5 моль/дм³ розчином сірчаної кислоти до слабкорожевого забарвлення) і додають 15 см³ хлороформу, 10 см³ змішаного індикатору та 10 см³ 0,004 моль/дм³ розчину гіаміну 1622. Зникнення рожевого і поява сіро-синього забарвлення свідчить про наявність залишків мийних засобів на основі аніонних поверхнево-активних речовин.

Контроль мікробіологічної чистоти технологічного обладнання

Контроль мікробіологічної чистоти обладнання проводять не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфікуючими розчинами та відповідної експозиції.

Проведення випробувань: Кожний тампон ретельно виполіскують у пробірці, щомістить 10 мл стерильного буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7.0.

З кожної пробірки, яка вміщує змивну рідину, роблять посів по 1 мл в дві чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій та в дві - з середовищем для вирощування грибів, використовуючи один з приведених нижче методів, описаних в ДФУ (розділ 2.6.12) для випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів

- метод глибинного висівання;
- метод двошарового висівання.

Чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій інкубують при температурі 32.5 ± 2.5 °С, з середовищем для вирощування грибів - при температурі 22.5 ± 2.5 °С не менше 5 діб.

При проведенні випробування на наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* та *P.aeruginosa* 5 мл змивної рідини вносять у 50 мл відповідних рідких поживних середовищ, які інкубують при температурі 32.5 ± 2.5 °С протягом 48 год.

Облік результатів: Після закінчення терміну інкубації проводять перегляд чашок на наявність росту мікроорганізмів. При проведенні випробувань на наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S.aureus* і *P.aeruginosa* ідентифікацію

мікроорганізмів проводять використовуючи методи, які описані у ДФУ (розділ 2.6.13).

У змивах з технологічного обладнання безпосередньо після їх обробки не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми.

Контроль повноти видалення дезінфікуючих засобів з поверхні обладнання

Повноту видалення залишків дезінфекційних та мийно-дезінфекційних засобів з об'єктів хіміко-фармацевтичної промисловості контролюють шляхом визначення вмісту залишкової кількості активної діючої речовини в останній порції промивної води.

Повноту видалення перекису водню з поверхні об'єктів контролюють шляхом додавання до 1 см³ останньої порції промивної води 0.2 см³ розведеної соляної кислоти, 2 см³ ефіру для наркозу та 0.2 см³ розчину біхромату калію. Поява синього забарвлення ефірного шару після збовтування свідчить про наявність залишків перекису водню на поверхні оброблених об'єктів.

Допускається контролювати повноту видалення залишків дезінфекційних та мийно-дезінфекційних засобів з групи окислювачів (дезактин, перекис водню, хлорантоїн) з робочих поверхонь технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, внутрішньоцехової тари за допомогою індикаторного йод-крохмального паперу (ТУ 6-09-3409). Індикаторний йод-крохмальний папір звожують промивною водою з відповідного об'єкту. Зміна кольору індикаторного паперу до синього чи синьо-чорного свідчить про наявність залишків дезінфекційних засобів з групи окислювачів на поверхні об'єкту.

Контроль вмісту мікроорганізмів в повітрі

Контроль вмісту мікроорганізмів в повітрі виробничих приміщень слід проводити під час виробничого процесу приміщень класу D не рідше одного разу на тиждень аспіраційним методом, який заснований на принципі ударної дії струму повітря. Використовують пробовідбірники інерційного типу (імпактори).

Випробування аспіраційним методом: У кожній контрольній точці відбирають проби в дві або більше чашки Петрі з поживним середовищем для вирощування бактерій та поживним середовищем для вирощування грибів.

Об'єм проби залежить від очікуваної концентрації мікроорганізмів у повітрі. Сумарний об'єм проби має бути таким, щоб для кожної контрольної точки сумарне число колоній, які зросли на поверхні агару в усіх чашках Петрі, було не менше 40.

Мінімальний сумарний об'єм проби V (м^3) у кожній контрольній точці обчислюють за формулою:

$$V = \frac{40}{N}$$

Де N - максимальна допустима кількість мікроорганізмів в 1м^3 повітря приміщень класу чистоти, що досліджується.

Мінімальний об'єм проби $V(i)$ (м^3), що припадає на кожну чашку, обчислюють за формулою:

$$V = \frac{V_i}{n}$$

Де V - мінімальний сумарний об'єм проби в кожній контрольній точці; n - кількість чашок Петрі, що використовуються в кожній контрольній точці.

Облік та інтерпретація результатів: Після закінчення інкубації проводять підрахунок кількості колоній мікроорганізмів, що утворилися в чашках Петрі з кожним поживним середовищем, знаходять середнє арифметичне значення і обчислюють кількість бактерій та грибів в 1 м^3 повітря.

Максимально допустима кількість мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) в 1 м^3 повітря для приміщення класу D становить 200 КУО.

Методики контролю ракіцидіну в капсулах наведені у розділі 1.3.

Карта постадійного контролю наведена у *табл. 15.1*.

Карта контролю

Таблиця 15.1

Карта постадійного контролю виробництва ракіцидіну в капсулах

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Км 1.3 Підготовка до роботи у чистих приміщеннях	Руки персоналу, кількість колонуючих одиниць	Мікробіологічний метод, метод змивів тампонами	Не рідше одного разу на місяць безпосередньо після їх обробки перед надяганням рукавичок, під час виробничого процесу - не рідше одного разу на тиждень вибірково у декількох робітників.	Після обробки рук антисептиками в змивах з рук не повинні міститися життєздатні мікроорганізми. Під час виробничого процесу в змивах з рук (рукавичок) допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см ² площі поверхні одягу чи площі однієї рукавички та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S.aureus</i> та <i>P.aeruginosa</i> .
Кт, Кх 2.1 Прання технологічного одягу	Одяг, концентрація миючого засобу, температура води, час прання	Хімічний метод, термометр технічний, годинник	Під час прання одягу	C=0,3%, t=90 ⁰ C, τ = 20-30 хв
Кт 2.2 Ополіскування технологічного одягу	Одяг, час ополіскування	Годинник	Під час ополіскування одягу	τ = 20-30 хв
Кт 2.3. Сушіння технологічного одягу	Одяг, температура повітря, час сушіння	Термометр технічний, годинник	Під час сушіння одягу	t=100 ⁰ C, τ = 120 хв
Кт 2.5 Стерилізація технологічного одягу	Одяг, тиск температура пари, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Під час стерилізації одягу	P=0,11 МПа, t=132 ⁰ C, τ = 45 хв

Продовження табл. 15.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 2.6 Зберігання технологічного одягу	Одяг, вологість повітря, кількість колонійутворюючих одиниць	Логометр, мікробіологічний метод	Під час зберігання одягу, мікробіологічний контроль - вибірково у декількох робітників не рідше одного разу на тиждень.	W=60%, у змивах допускається наявність не більше 10 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) на 100 см ² площі поверхні, при відсутності бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i>
Кт, Кх 3.1 Приготування розчину перекису водню 3 та 6%	Розчин перекису водню, концентрація розчину, час зберігання	Хімічний метод, годинник	Після приготування розчину	C=3%, 6%, τ = 24 год
Кт, Кх 3.2 Приготування розчину етанолу 76%	Розчин етанолу, концентрація розчину, час зберігання	Хімічний метод, годинник	Після приготування розчину	C=76%, τ = 5-6 діб
Кх 3.3 Приготування робочого розчину «Гуасепт»	Розчин «Гуасепт», концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,3%
Кх 3.4 Приготування робочого розчину «Бланідас Актив»	Розчин «Бланідас Актив», концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,1%
Кт, Кх 4.1 Щоденне прибирання	Поверхні виробничих приміщень; кількість колонеутворюючих одиниць, наявність миючих засобів	Мікробіологічний метод змивів тампонами або метод відбитків, хімічний метод за залишками аніонних поверхнево-активних речовин	Мікробіологічний контроль - не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфекційними розчинами, хімічний контроль - кожного разу	Безпосередньо післяобробки дезінфекційними розчинами не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми. У процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см ² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> та <i>P. aeruginosa</i> ; відсутність залишків миючих розчинів на поверхні приміщень

Продовження табл. 15.1

1	2	3	4	5
Кт, Кх 4.2. Генеральне прибирання	Поверхні виробничих приміщень; кількість колонеутворюючих одиниць, наявність миючих засобів	Мікробіологічний метод змивів тампонами або метод відбитків, хімічний метод за залишками аніонних поверхнево-активних речовин	Мікробіологічний контроль - не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфекційними розчинами, хімічний контроль - кожного разу	Безпосередньо після обробки дезінфекційними розчинами не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми. У процесі виробництва допускається не більше 1 КУО на 100 см ² площі поверхні та не допускається наявність бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> та <i>P. aeruginosa</i> ; відсутність залишків миючих розчинів на поверхні приміщень
Кт 5.1 Миття обладнання та комунікацій	Обладнання та комунікації, температура води	Термометр технічний	Під час миття обладнання	t=40-60 °C
Кт 5.3 Дезінфекція обладнання	Обладнання та комунікації, час дезінфекції, кількість колонеутворюючих одиниць, наявність дезінфікуючих засобів	Годинник, мікробіологічний метод змивів тампонами, хімічний метод	Під час дезінфекції обладнання, мікробіологічний контроль - не рідше одного разу на місяць після обробки дезінфекційними розчинами та відповідної експозиції, хімічний контроль – кожного разу	τ = 2-3 год, у змивах з технологічного обладнання безпосередньо після їх обробки не повинні знаходитися життєздатні мікроорганізми, відсутність залишків дезінфікуючих розчинів на поверхні обладнання
Кт 6.1 Подача води	Вода питна, температура води	Термометр технічний	Під час подачі води	t=25 °C
Кт 6.2.1 Очистка води через пісочний фільтр	Вода після пісочного фільтру, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P=3-4 бар
Кт 6.2.3 Пом'якшення води	Вода після пом'якшення, жорсткість води	Хімічний метод	Після пом'якшення	C= не більше 0,3 мг-екв/дм ³

Продовження табл. 15.1

1	2	3	4	5
Кт 6.2.4 Остаточка очистка від механічних домішок	Вода питна, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P=3,5-4 бар
Кт 6.3.1 Зворотноосмотичне фільтрування	Вода знесолена, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P=30-65 бар
Кт 7.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 65-90 % (частинок розміром 5 мкм) тиск згідно паспорту
Кт 7.4 Регуляція термодинамічних показників повітря	Повітря, температура, вологість	Термометр, логометр	Після кондиціонування повітря	t = 30-35 °C, W=60%
Кт 7.5 Тонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 70 % (частинок розміром 1 мкм) тиск згідно паспорту
Кт 7.6 Надтонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення, кількість колонеутворюючих одиниць	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після очистки повітря у фільтрі надтонкого очищення, мікробіологічний контроль- не рідше 1 разу на тиждень	E = 99,95 % (частинок розміром 0,3 мкм) тиск згідно паспорту, не більше 200 КУО на м ³
Кт 8.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, частота обертання, час	Годинник, датчик обертів	Під час процесу центрифугування	n=3800 об/хв τ=45 хв
Кт 9.1 Упарювання ракіцидіну	Супернатант, час	Годинник,	Під час процесу очищення	τ=24 год, m=100 кг
Кт 10.1 Ультрафільтрація ракіцидіну	Супернатант, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу ультрафільтрації	t = 20 °C τ=30 хв, d пор = 2 нм

				<i>Продовження табл. 15.1</i>
Кт 11.1 Хроматографія	Концентрат ракіцидіну, темпаратури, час	Годинник, Термометр технічний,	Під час процесу концентрування	$\epsilon = \text{MeCN}-0, 1\%,$ $\tau = 30 \text{ хв}$
Кт 12.1 Кристалізація ракіцидіну	Концентрат ракіцидіну, час	годинник	Під час процесу кристалізації	$t_1 = 65-70^\circ\text{C}, t_2 = 6-8^\circ\text{C}, \tau = 5 \text{ год}$
Кт 12.1 Сушіння ракіцидіну	Кристалічний осад ракіцидіну, температура, час	Годинник, датчик температури, манометр, датчик вологості	Під час процесу сушіння	$t = 50^\circ\text{C}, \tau = 16 \text{ год}, n = 5$ об/хв, $P = 6,6 \text{ мбар}, W = 5\%$
Кт 14.2 Просіювання сировини	Діюча та допоміжні речовини, діаметр сита	Візуальний контроль	Перед просіюванням	Діаметр отворів сита по номеру сита: Сито №20- ($2,0 \pm 0,070$)мм; №10- ($1,0 \pm 0,070$)мм; №32- ($0,2 \pm 0,030$)мм; №38- ($0,2 \pm 0,195$)мм
Кт 15.1. Змішування	Діюча та допоміжні речовини, час	Годинник	Під час змішування	$\tau = 3 \text{ хв}$

Закінчення табл. 15.1

1	2	3	4	5
Кт 16.1 Наповнення капсул	Капсули, тиск повітря, тиск вакууму	Манометр технічний	Під час наповнення	Р(повітря)=6 бар (0,6 МПа), Р(вакууму)=0,02 бар (0,002 МПа)
Кт 17.1 Фасування капсул у флакони	Капсули, кількість капсул у флаконі	Датчик наповнення	Під час фасування	N= 90 капсул
Кт 18.3. Пакування пачок у групову тару	Пачки, кількість пачок у коробці	Візуальний контроль	Під час пакування	N= 35 шпук
Кт 19.3. Очистка відпрацьованого повітря	Повітря, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 65-90 % (частинок розміром 5 мкм) тиск згідно паспорту

Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp.

Yasuhiro Igarashi¹, Ryoko Shimasaki¹, Satoshi Miyana¹, Naoya Oku¹, Hiroyasu Onaka¹, Hiroaki Sakurai², Ikuo Saiki², Shigeru Kitani³, Takuya Nihira^{3,5}, Waurawan Wimonwong^{4,5} and Watanalai Panbangred^{4,5}

The Journal of Antibiotics (2010) **63**, 563–565; doi:10.1038/ja.2010.70; published online 30 June 2010

Keywords: invasion inhibitor; rakicidin; *Streptomyces*

Tumor metastasis is the leading cause of death in cancer patients. It is the process by which a tumor cell leaves the primary tumor, disseminates to a distant site through the circulatory system and establishes a secondary tumor.¹ During the metastatic cascade, tumor cells must pass through the extracellular matrix barriers to accomplish the metastasis. Although the genetic basis of tumorigenesis can vary greatly, the steps required for metastasis are similar for all tumor cells. Therefore, interruption of metastasis is a promising approach to the treatment of cancers of various genetic origins. In our continuing search for anti-invasive compounds from microbial secondary metabolites,^{2–5} rakicidin D (**1**) was isolated from the culture broth of an actinomycete strain of the genus *Streptomyces*. Rakicidins are the 15-membered depsipeptides consisting of three amino acids and a 3-hydroxyfatty acid (Figure 1). To date, three congeners, rakicidins A (**2**) and B (**3**) from *Micromonospora* and rakicidin C (**4**) from *Streptomyces*, have been reported.^{6,7} Rakicidins contain a rare unusual amino acid, 4-amino-2,4-pentadienoate, which has been found only in the secondary metabolites from actinomycetes. Except for rakicidins, only two classes of cyclic peptides, BE43547⁸ and vinylamycin,⁹ are reported to date to contain this unusual amino acid. Herein, we describe the isolation, structure elucidation and biological properties of rakicidin D (**1**).

The producing strain *Streptomyces* sp. MWW064 was isolated from a marine sediment sample collected in Samut Sakhon province, Thailand. The strain was cultured in our standard medium for actinomycetes and the whole culture broth was extracted with 1-butanol. The extract showed inhibitory activity toward tumor cell invasion into Matrigel, the reconstituted extracellular matrix proteins.¹⁰ Bioassay-guided fractionation of the extract led to the isolation of a new compound, rakicidin D (**1**).

Compound **1** was obtained as a colorless amorphous powder. The high-resolution ESITOFMS indicated a molecular formula of

C₂₄H₃₈N₄O₇, which was consistent with the ¹H and ¹³C NMR data. The IR spectrum of **1** indicated the presence of OH or NH (3356 cm⁻¹) and carbonyl (1688 and 1648 cm⁻¹) functionalities. The UV spectrum and the ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** showed high similarity to those for rakicidins A and B.⁷ The ¹³C NMR and HMQC analysis confirmed the presence of 24 carbons attributable to six deshielded signals including carbonyl carbons, two sp² methines, one sp² methylene, five sp³ methines, six sp³ methylenes, four methyl carbons and five exchangeable protons.

2-Amino-2,4-pentadienoate moiety was elucidated by a COSY correlation for H-9/H-10 and a series of HMBC correlations from H-12 to C-10 and C-11, from H-10 to C-8, C-11 and C-12, and from H-9 to C-8 and C-10 (Figure 2). An NOE between H-10 and an exomethylene proton at δ_{H} 5.41 indicated that the latter proton and C-10 were located on the same side of the C-11/C-12 double bond. *E* configuration for the double bond between C-9 and C-10 was confirmed by a large coupling constant for H-9 and H-10 ($^3J_{\text{HH}}=15.0$ Hz). HMBC correlations from H-7 to C-6 and C-8, and from H-6 to C-5 and C-8 established the connectivity of *N*-methylglycine and the pentadienoate. COSY correlations for 2-NH/H-2/H-3 and HMBC correlations from H-2 to C-1, H-3 to C-4 and 4-NH₂ to C-3 confirmed the presence of a β -hydroxyasparagine moiety. Connection of this amino acid to the glycine moiety was established by an HMBC correlation from 2-NH to C-5. Three additional fragments, H-23/H-14/H-15, H-24/H-16 and H-21/H-22, were recognized from the COSY spectrum. HMBC correlations from H-23 to C-13, C-14 and C-15, and from H-24 to C-15, C-16 and C-17, established the 2,4-dimethyl-3-hydroxyalkanoate substructure. Connectivity of this fragment to the peptide unit was elucidated by HMBC correlations from 11-NH to C-13 and from H-15 to C-1. Finally, the fragment C-22/C-21 containing the triplet methyl group, the methylene fragment C-20 that had an HMBC correlation from H-22 and

¹Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University, Imizu, Toyama, Japan; ²Department of Bioscience, Institute of Natural Medicine, Toyama University, Sugitani, Toyama, Japan; ³International Center for Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; ⁴Faculty of Science, Department of Biotechnology, Mahidol University, Bangkok, Thailand and ⁵Mahidol University and Osaka University Collaborative Research Center on Bioscience and Biotechnology, Bangkok, Thailand
Correspondence: Dr Y. Igarashi, Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 939-0398, Japan.
E-mail: yas@pu-toyama.ac.jp

Received 1 March 2010; revised 26 May 2010; accepted 27 May 2010; published online 30 June 2010

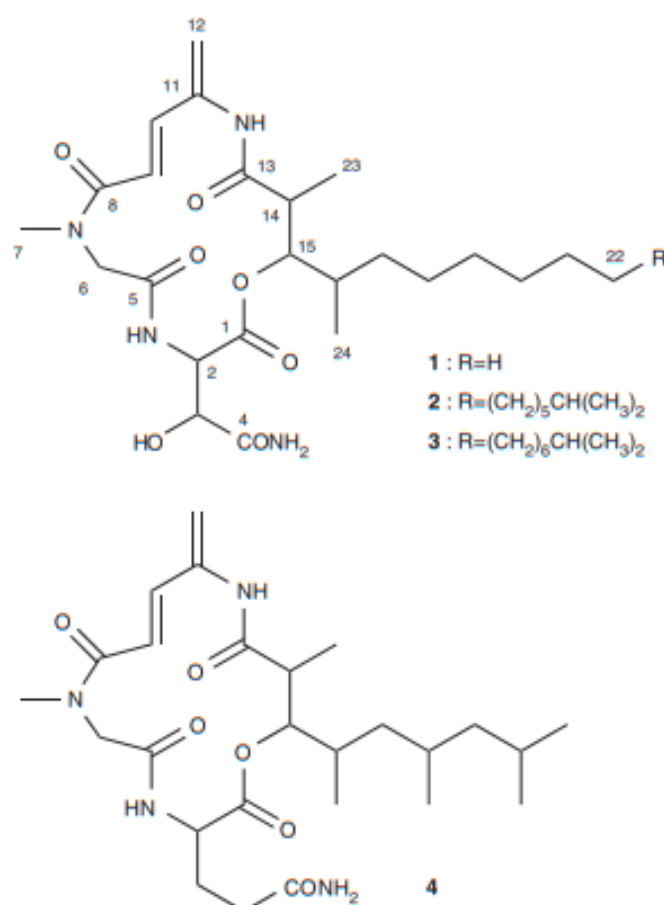


Figure 1 Structure of rakicidins D (1), A (2), B (3) and C (4).

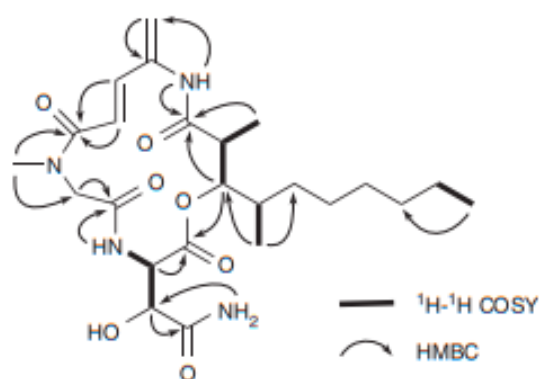


Figure 2 ¹H-¹H COSY and key HMBC correlations for 1.

the remaining two CH₂ fragments (C-18 and C-19) were assigned to the terminal linear moiety of the alkanolate to complete the planar structure of 1. Compound 1 has the same amino-acid components as rakicidins A and B but a shorter side chain with no terminal methyl branching in the fatty acid moiety.

Rakicidin D (1) inhibited the invasion of murine carcinoma colon 26-L5 cells with an IC₅₀ of 3.3 µg ml⁻¹ (=6.7 µM), whereas it showed no growth inhibition toward the same cell line at 10 µg ml⁻¹.¹⁰ Rakicidins A (2) and B (3), which were separately obtained from *Micromonospora* sp. TP-A0860. Rakicidin B was described to have an

isopropyl terminus in the fatty acid moiety but also described to have 3-hydroxy-2,4,16-trimethyloctadecanoic acid (*anteiso*-terminus), while the NMR data for rakicidin B were not provided in the literature. We thus reisolated rakicidin B and unambiguously confirmed that it had an *iso*-terminus on the basis of NMR analysis (see Supplementary Information). Compounds 2 and 3 showed much higher cytotoxicity toward the same cell line (IC₅₀=0.44 µg ml⁻¹ and 0.17 µg ml⁻¹), giving a suggestion that the alkyl side chain of the fatty acid moiety has a key role in cytotoxic effect. Anti-invasive effects of 2 and 3 were not observed at noncytotoxic concentrations.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

General experimental procedure

Optical rotations were measured using a JASCO DIP-3000 polarimeter (JASCO, Tokyo, Japan). UV spectrum was recorded on a Hitachi U-3210 spectrophotometer (Hitachi, Ibaraki, Japan). IR spectrum was measured on a PerkinElmer Spectrum 100 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). NMR spectra were obtained on a Bruker AVANCE 400 or a Bruker AVANCE 500 spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) in dimethyl sulfoxide-*d*₆ using the signals of the residual solvent protons (δ_H 2.49) and carbons (δ_C 39.8) as internal standard. HRESITOFMS were recorded on a Bruker microTOF focus.

Microorganism

Strain MWW064 was isolated from a sediment sample collected in Samut Sakhon province, Thailand. The strain was identified as a member of the genus *Streptomyces* on the basis of 99.0% 16S rRNA gene sequence (1431 nucleotides; DDBJ, DNA Data Bank of Japan, accession number GU295447) identity with *Streptomyces argenteolus* subsp. *toyomakensis* NBRC13847 (accession number AB184528.1).

Fermentation

Strain MWW064 cultured on a slant agar medium was inoculated into 500-ml K-1 flasks each containing 100 ml of the V-22 seed medium consisting of soluble starch 1%, glucose 0.5%, NZ-case 0.3%, yeast extract 0.2%, triptone (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05% and CaCO₃ 0.3% (pH 7.0). The flasks were cultivated on a rotary shaker (200 r.p.m.) at 30 °C for 4 days. The seed culture (3 ml) was transferred into 500-ml K-1 flasks each containing 100 ml of the A-3M production medium consisting of glucose 0.5%, glycerol 2%, soluble starch 2%, Pharmamedia (Traders Protein, Memphis, TN, USA) 1.5%, yeast extract 0.3% and Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical, Kanagawa, Japan) 1%. The pH of the medium was adjusted to 7.0 before sterilization. The inoculated flasks were cultured on a rotary shaker (200 r.p.m.) at 30 °C for 6 days.

Extraction and isolation

At the end of the fermentation period, 50 ml of 1-butanol was added to each flask, and they were allowed to shake for 1 additional hour. The mixture was centrifuged at 6000 r.p.m. for 10 min and the organic layer was separated from the aqueous layer containing the mycelium. Evaporation of the solvent gave 27.9 g of crude extract from 3 liter of culture. The crude extract (27.9 g) was subjected to silica gel column chromatography with a step gradient of CHCl₃-MeOH (1:0, 20:1, 10:1, 4:1, 2:1, 1:1 and 0:1, v/v). Fractions six and seven were concentrated to provide 0.79 g of dark viscous oil, which was further purified by reversed phase octadecyl silane column chromatography with a gradient of MeCN-0.1% HCOOH (28, 3:7, 46, 5:5, 64, 7:3 and 8:2, v/v). Fraction 4 (50:50) was evaporated and the remaining aqueous solution was lyophilized to afford 1 (66 mg) as a colorless amorphous solid. Production of metabolites analogous to rakicidins was not detected in the culture extract.

Rakicidin D (1). Colorless amorphous solid; [α]_D²⁵ -140 (c 0.20, dimethyl sulfoxide); UV (30% MeCN) λ_{max} (log ε) 207 (4.57), 261 (4.18); IR (neat) ν_{max} 3371, 2930, 1688, 1648 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1 (¹H and ¹³C NMR spectra are shown in Supplementary Figures S1 and S2 of Supplementary Information); HRESITOFMS [M-H]⁻ 493.2665 (calcd for C₂₄H₃₇N₄O₇, 493.2668).

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR data for rakicidin D (1) in $\text{DMSO}-d_6$

Position	δ_{C}^a	δ_{H} mult (J in Hz) ^b	HMBC ^{b,c}
1	169.2, qC		
2	54.9, CH	4.88, dd (10.0, 1.8)	1, 3
3	72.5, CH	4.18, br.s	2, 4
4	172.7, qC		
5	167.6, qC		
6	52.5, CH ₂	4.46, d (18.2) 3.68, d (18.2)	5, 7 5, 7, 8
7	36.5, CH ₃	2.94, s	6, 8
8	166.0, qC		
9	118.8, CH	6.16, d (15.0)	8, 10
10	137.9, CH	6.86, d (15.0)	8, 11, 12
11	138.4, qC		
12	117.1, CH ₂	5.43, s 5.32, s	11 10, 11
13	172.5, qC		
14	41.7, CH	2.89, dq (9.9, 7.0)	13, 15, 23
15	78.1, CH	5.11, d (9.9)	1, 13, 14, 24
16	33.9, CH	1.69, m	24
17	32.8, CH ₂	1.35, m 1.13, m	
18	27.0 ^d , CH ₂	1.32, m 1.22, m	
19	28.9 ^d , CH ₂	1.22, m	
20	31.3, CH ₂	1.22, m	
21	22.1, CH ₂	1.26, m	
22	14.0, CH ₃	0.85, t (6.6)	20, 21
23	15.4, CH ₃	1.04, d (7.0)	13, 14, 15
24	13.3, CH ₃	0.93, d (6.8)	15, 16, 17
2-NH		8.09, d (10.0)	5
4-NH ₂		7.31, s 7.29, s	3 3
11-NH		8.90, s	12, 13

^aRecorded at 100 MHz.

^bRecorded at 500 MHz.

^cHMBC correlations are from proton(s) stated to the indicated carbon.

^dInterchangeable.

Isolation of rakicidins A and B. Rakicidins A (2) and B (3) were obtained from the culture extract of *Micromonospora* sp. TP-A0860.¹¹

Rakicidin A (2). Colorless amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -126 (*c* 0.10, dimethyl sulfoxide); ^1H and ^{13}C NMR data were identical with those reported in the literature;⁶ HRESITOFMS $[\text{M}-\text{H}]^-$ 605.3927 (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7$, 605.3920).

Rakicidin B (3). Colorless amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -90 (*c* 0.10, dimethyl sulfoxide); ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Supplementary Table S1 in Supplementary Information (^1H and ^{13}C NMR spectra are shown in Supplementary Figures S3 and S4 of Supplementary Information; described earlier). HRESITOFMS $[\text{M}-\text{H}]^-$ 619.4072 (calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7$, 619.4076).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported in part by a research grant from Mahidol University to WP.

- 1 Geho, D. H., Bandle, R. W., Clair, T. & Liotta, L. A. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology* **20**, 194–200 (2005).
- 2 Igarashi, Y. et al. Brantemycin, an inhibitor of tumor cell invasion from the actinomycete *Nonomuraea* sp. *J. Nat. Prod.* **79**, 980–982 (2009).
- 3 Miyana, S., Sakurai, H., Saiki, I., Onaka, H. & Igarashi, Y. Anti-invasive and anti-angiogenic activities of naturally occurring dibenzodiazepine BU-4664L and its derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 963–965 (2010).
- 4 Miyana, S., Sakurai, H., Saiki, I., Onaka, H. & Igarashi, Y. Synthesis and evaluation of myxochelin analogues as antimetastatic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2724–2732 (2009).
- 5 Igarashi, Y. et al. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 3702–3705 (2007).
- 6 McBrien, K. D. et al. Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **48**, 1446–1452 (1995).
- 7 Hu, J.-F. et al. Rakicidin C, a new cyclic depsipeptide from *Streptomyces* sp. *Eur. J. Org. Chem.* 3353–3356 (2000).
- 8 Nishioka, H., Nakajima, S., Nagashima, M., Kojiri, K. & Suda, H. (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.). BE-43547 series substances, their manufacture with *Streptomyces* species, and their use as antitumor agents. JP 10147594 A 19980602 (1998).
- 9 Igarashi, M. et al. Vinylamycin, a new depsipeptide antibiotic, from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **59**, 873–879 (1999).
- 10 Saito, K. I., Oku, T., Ata, N., Miyashiro, H., Hattori, M. & Saiki, I. A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors. *Biol. Pharm.* **20**, 345–348 (1997).
- 11 Igarashi, Y., Miyana, S., Onaka, H., Takeshita, M. & Furumai, T. Revision of the structure assigned to the antibiotic BU4664L from *Micromonospora*. *J. Antibiot.* **58**, 350–352 (2005).

Supplementary Information accompanies the paper on The Journal of Antibiotics website (<http://www.nature.com/ja>)

JITEPATYPA:

1. A. Janardhan, A.P. Kumar, B. Viswanath, et al. Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties *Biotechnol. Res. Int.*, 20 (2014), pp. 1-8
<https://www.hindawi.com/journals/btri/2014/217030/>
2. K. Saurav, K. Kannabiran Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp *Saudi J. Biol. Sci.*, 19 (2012), pp. 81-86
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730557/>
3. A. Becerril-Espinosa, G. Guerra-Rivas, N. Ayala-Sánchez, et al. Antitumor activity of actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 47 (2012), pp. 317-325
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-19572012000200013&lng=en&nrm=i.p
4. S.A. El-Shatoury, N.S. El-Shenawy, I.M.A. El-Salam Antimicrobial, antitumor and in vivo cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish/*World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (2009), pp. 1547-1555
<https://comunicatascientiae.com.br/comunicata/article/view/2269>
5. K. Hong, A. Gao, Q. Xie, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China *Mar. Drugs*, 7 (2009), pp. 24-44
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19370169/>
6. K. Suthindhiran, K. Kannabiran Cytotoxic and antimicrobial potential of actinomycete species *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 isolated from the Bay of Bengal coast of India *Am. J. Infect. Dis.*, 5 (2009), pp. 90-9
https://www.researchgate.net/publication/26623441_Cytotoxic_and_Antimicrobial_Potential_of_Actinomycete_Species_Saccharopolyspora_salina_VITSDK4_Isolated_from_the_Bay_of_Bengal_Coast_of_India
7. A.Y.G. Tan, S. Robinson, E. Lacey, et al. *Amycolatopsis regifaucium* sp. nov., a novel actinomycete that produces kigamicins *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57 (2007), pp. 2562-2567

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17978218/>

8. H. Lovborg, P. Nygren, R. Larsson Multiparametric evaluation of apoptosis: effects of standard cytotoxic agents and the cyanoguanidine CHS 828 *Mol. Cancer Ther.*, 3 (2004), pp. 521-526

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15141009/>

9. Erba, E; Bergamaschi, D; Ronzoni, S; Faretta, M; Taverna, S; Bonfanti, M; Catapano, CV; Faircloth, G; Jimeno, J; D'Incalci, M. Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumour activity. *Br J Cancer* 1999, 80, 971–980.

<https://www.nature.com/articles/6690451>

10. Tan L.T., Chan K.G., Pusparajah P., Yin W.F., Khan T.M., Lee L.H., Goh B.H. Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticancer agents. *BMC microbiology*. 2019, 19(1): 38. doi: 10.1186/s12866-019-1409-7.

<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1409-7>

11. Dhakal D., Sohng J.K. Pandey R.P. Engineering actinomycetes for biosynthesis of macrolactone polyketides. *Microb Cell Fact.* 2019, 18:137. doi:10.1186/s12934-019-1184-z.

<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-019-1184-z>

12. A. Bahri, E. Moazamyan, N. Azarpira. Molecular identification, isolation and evaluation of Gulf Actinomycetes as candidates for cytotoxic metabolites against breast cancer. *Department of Microbiology*, 2017, 15:103. doi:10.1186/s12934-019-1184-z

<https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-Identification%2C-Isolation-and-Evaluation-Bahri-Moazamian/9da613a01397afeab8d9c4eb6b0f59fb0a84ea62>

13. Asolkar, RN; Freel, KC; Jensen, PR; Fenical, W; Kondratyuk, TP; Park, EJ; Pezzuto, JM. Arenamides A-C, cytotoxic NF- κ B inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Nat Prod* 2009, 72, 396–402.

<https://europepmc.org/article/pmc/pmc2837138>

14. Bhadra, B., Raghukumar, C. Pindi, PK, Shivaji, S .. *Brevibacterium oceani* sp. November, isolated from the deep sediments of the trench Chagos, Indian Ocean. International J. System. Evol. Microbiol. 58, 57–60. doi: 10.1099 / ijs.0.64869-0, 2015.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00760/full>
15. Bian, J., Li, Y., Wang, J., Song, FH, Liu, M., Dai, HQ, et al. *Amycolatopsis marina* sp. leaf., actinomycete isolated from ocean sediment. International J. System. Evol. Microbiol. 59, 477–481. doi: 10.1099 / ijs.0.000026-0, 2017.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5984834/>
16. Chen, P., Zhang L., Guo, X., Dai, X., Liu, L., Xi, L. Diversity, biogeography and biodegradation potential of actinobacteria in deep-water sediments along deep-water sediments along the Southwest Indian Range. Microbiol. 7: 1340. doi: 10.3389 / fmicb.2016.01340, 2016.
<https://europepmc.org/article/pmc/pmc5002886>
17. Dai, HQ, Wang, J., Xin, YH, Pei, G., Tang, SK, Ren, B., et al. *Verrucospora sediminis* sp. Nov., a cyclodipeptide that produces actinomycetes from deep-water sediments International J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1807–1812. doi: 10.1099 / ijs.0.017053-0, 2015
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410581/>
18. Macyma Lorico, A; Long, BH. Biochemical characterisation of elsamicin and other coumarin-related antitumour agents as potent inhibitors of human topoisomerase II. *Eur J Cancer* 1993, 29A, 1985–1991.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8280493/>
19. X. Gao, Y. Lu, Y. Xing, *et al.* A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17 Microbiol. Res., 167 (2012), pp. 616-622
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501312000304>
20. S. Kunitomo, J. Lu, H. Esumi, *et al.* Novel antitumor antibiotics I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities J. Antibiot (Tokyo), 56 (2003), pp. 1004-1011

https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/56/12/56_12_1004/_article

21. Zheng, Z; Zeng, W; Huang, Y; Yang, Z; Li, J; Cai, H; Su, W. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett* 2000, 188, 87–91.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10867239/>
22. Gupta, RS; Murray, W; Gupta, R. Cross resistance pattern towards anticancer drugs of a human carcinoma multidrug-resistant cell line. *Br J Cancer* 1988, 58, 441–447.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3207599/>
23. Richardson, AD; Ireland, CM. A profile of the *in vitro* antitumor activity of lissoclinolide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 195, 55–61.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14962505/>
24. Xu, Z; Jakobi, K; Welzel, K; Hertweck, C. Biosynthesis of the antitumor agent chartreusin involves the oxidative rearrangement of an anthracyclic polyketide. *Chem Biol* 2005, 12, 579–588.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552105001298>
25. McGovren, JP; Neil, GL; Crampton, SL; Robinson, MI; Douros, JD. Antitumor activity and preliminary drug disposition studies on chartreusin (NSC 5159). *Cancer Res* 1977, 37, 1666–1672.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/870180/>
26. Tan L.T., Chan K.G., Pusparajah P., Yin W.F., Khan T.M., Lee L.H., Goh B.H. Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticolon-cancer agents. *BMC microbiology*. 2019, 19(1): 38. doi: 10.1186/s12866-019-1409-7.
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1409-7>
27. Chen, P., Zhang L., Guo, X., Dai, X., Liu, L., Xi, L. Diversity, biogeography and biodegradation potential of actinobacteria in deep-water sediments along deep-water sediments along the Southwest Indian Range. *Microbiol*. 7: 1340. doi: 10.3389 / fmicb.2016.01340, 2016.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27621725/>

28. Imamura, N; Kakinuma, K; Ikekawa, N; Tanaka, H; Omura, S. Biosynthesis of vineomycins A1 and B2. *J Antibiot* 1982, 37, 602–607.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/56/11/56_11_942/_article/-char/ja/
29. Olano, C; Méndez, C; Salas, JA. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* 2009, 26, 628–660.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19387499/>
30. Abdel-Mageed, W. M, Milne, BF, Wagner, M., Schumacher, M., Sandor, P., Pathom-aree, W., et al. Dermacosins, a new family of phenazines from deep-sea dermacocci isolated from the sediment of the Mariana Trench. *Org. Biomol. Chem.* 8, 2352–2362. doi: 10.1039.
<https://www.mdpi.com/1660-3397/18/3/131/html>
31. Shin, DY; Shin, HJ; Kim, GY; Cheong, J; Choi, IW; Kim, SK; Moon, SK; Kang, HS; Choi, YH. Streptochlorin isolated from *Streptomyces* sp. Induces apoptosis in human hepatocarcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *J Microbiol Biotechnol* 2008, 18, 1862–1868.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100343
32. S. Jemimah Naine, C. Subathra Devi, V. Mohanasrinivasan, Vaishnavi B. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. School of Biosciences and Technology; VIT University; Vellore, Tamil Nadu – India. *Braz. arch. biol. technol.* vol.58 no.2 Curitiba Mar./Apr. 2015 Epub Oct 14, 2014
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132015000200198

33. Yoshiharu Mizui, Takashi Sakai, Masao Iwata, Toshimitsu Uenaka, Kiyoshi Okamoto, Hajime Shimizu, Takao Yamori, Kentaro Yoshimatsu, Makoto Asada. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *Antibiot (Tokyo)*. 2004 Mar;57(3):188-96. doi: 10.7164/antibiotics.57.188.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/57/3/57_3_188/article
34. Jemimah Naine Selvakumar, Subathra Devi Chandrasekaran, and Mohanasrinivasan Vaithilingam. Bio Prospecting of Marine-derived *Streptomyces spectabilis* VITJS10 and Exploring its Cytotoxicity Against Human Liver Cancer Cell Lines. *Pharmacogn Mag*. 2015 Oct; 11(Suppl 3): S469–S473. doi: 10.4103/0973-1296.168974
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745219/>
35. Hefa Mangzira Kemung, Loh Teng-Hern Tan, Kok-Gan Chan, Hooi-Leng Ser, Jodi Woan-Fei Law, Learn-Han Lee, and Bey-Hing Goh. Antioxidant Activities of *Streptomyces* sp. strain MUSC 14 from Mangrove Forest Soil in Malaysia. Volume 2020/Article ID 6402607.
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/6402607/>
36. Jodi Woan-Fei Law¹, Hooi-Leng Ser¹, Acharaporn Duangjai^{2,3}, Surasak Saokaew, Sarah I. Bukhari⁵, Tahir M. Khan. *Streptomyces colonosanans* sp. nov., A Novel Actinobacterium Isolated from Malaysia Mangrove Soil Exhibiting Antioxidative Activity and Cytotoxic Potential against Human Colon Cancer Cell Lines. *Front. Microbiol.*, 16 May 2017.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28559892/>
37. Saket Siddharth and Ravishankar Rai Vittal. Evaluation of Antimicrobial, Enzyme Inhibitory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Partially Purified Volatile Metabolites of Marine *Streptomyces* sp.S2A. Department of Studies in Microbiology, University of Mysore, Received: 30 April 2018; Accepted: 13 July 2018; 18 July 2018
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30021990/>

38. Lalitha, P. Purification and characterization of bioactive metabolite produced by a marine bacterium *Staphylococcus* sp strain MB30. Department of Biotechnology, Pondicherry University. 18 July 2016
https://www.researchgate.net/publication/344690540_Bioactive_compound_isolated_from_marine_Bacillus_safensis_MB8_and_their_cytotoxicity_potential
39. M Liu, J C Pelling, J Ju, E Chu, D E Brash. Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. 1998 Apr 15;58(8):1723-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563490/>
40. Hisayuki Komaki, Arisa Ishikawa, Natsuko Ichikawa, Akira Hosoyama, Moriyuki Hamada, Enjuro Harunari, Takuya Nihira, Watanalai Panbangred, Yasuhiro Igarashi. Draft genome sequence of *Streptomyces* sp. MWW064 for elucidating the rakicidin biosynthetic pathway. 10.1186/s40793-016-0205-3
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27785333/>
41. Igarashi Y, Shimasaki R, Miyana S. et al. Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp. J Antibiot (Tokyo) 2010 року; 63: 9: 563-565.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20588298/>
42. Орлова Т. І. КОМПЛЕКСНЕ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ХІМІОРЕЗИСТЕНІЙ НЕДРІБНОКЛІТИННИЙ РАК ЛЕГЕНІ З УРАХУВАННЯМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПУХЛИНИ. Онкологія, научно-практичний журнал, Оригінальні дослідження. 8 3 2006 г.
<https://www.oncology.kiev.ua/ru/article/7004/kompleksne-likuvannya-xvorix-na-ximioresistenij-nedribnoklitinnij-rak-legeni-z-uraxuvannyam-molekulyarno-genetichnix-osoblivostej-puxlini-2>
43. Wei Sun, Fengli Zhang, Liming He, Loganathan Karthik, and Zhiyong Li. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery. Front Microbiol. 2015; 6: 1048. Published online 2015 Oct 1. doi: 10.3389/fmicb.2015.01048
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589764/>

44. Sean R. Johnson and Bernd Markus Lange. Open-Access Metabolomics Databases for Natural Product Research: Present Capabilities and Future Potential. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015; 3: 22. 2015 Mar 4. doi: 10.3389/fbioe.2015.00022.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349186/>
45. Jin-Feng Hu, Dirk Wunderlich, Isabel Sattler, Xiao-Zhang Feng, Susanne Grabley, Ralf Thiericke. Rakicidin C, A New Cyclic Depsipeptide from *Streptomyces* sp. 18 September 2000.
[https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200010\)2000:19<3353::AID-EJOC3353>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200010)2000:19<3353::AID-EJOC3353>3.0.CO;2-E)
46. Jian Chen, Jinpei Li, Lingling Wu, Yang Gen, Jianmin Yu, Chuangke Chong, Mengmeng Wang, Yuan Gao, Cuigai Bai, Yahui Din, Yue Chen, Quan Zhang. Synthesis and activity of anticancer cancer antiperspirant analogs to cancer A. *European Journal of Likarskoy Chemistry* 2018, 151, 601-627.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.078>
47. Jiang Hong, Lin Ru, Zheng. Wei, et al. Visualization, identification and biological activity of the FW523 lipid spoluca, the virobred marine bronze micro-monospore FIM02-523 [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31 (5): 267-270;
<https://wap.cnki.net/touch/web/Dissertation/Article/10386-1018052755.nh.html>
48. Huang Chongbiao (Chongbiao HUANG), *Xu Jie (Jie XU) and Li Zengxun (Zengxun LI. Research progress of tumor-associated fibroblasts in lung cancer *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2020 Apr 20; 23(4): 267–273, Chinese. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.102.16
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7210089/>
49. Sang-Jip Nam, Christopher A. Kauffman, Paul R. Jensen, and William Fenical. Isolation and Characterization of Actinoramides A-C, Highly Modified Peptides from a Marine *Streptomyces* sp 10.1016/j.tet.2011.04.051
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156444/>

50. Mojtaba Mohseni, Hamed Norouzi, Javad Hamed, and Aboulghasem Roohi. Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea. *Int J Mol Cell Med*. 2013 Spring; 2(2): 64–71.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920526/>
-