МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту (декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК__	_____ _Віктор СТАБНІКОВ__
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____лютого_____ 2024 р.	«___» _____лютого_____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: Метаболіти мікроміцетів для зниження рівня холестерину

Виконав: здобувач_2_ курсу, групи_2_

ДИМИЦЬКА Юлія Олександрівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Ярослав СМІТЮХ _____
(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) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач_____
(підпис)

Київ - 2023р.

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 СТАБНІКОВ_
"_06_" ___листопада___2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____ДИМИЦЬКОЇ Юлії Олександрівни_____
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи _Метаболіти мікроміцетів для зниження рівня холестерину_____ керівник роботи _СТАБНІКОВ Віктор Петрович доц., д.т.н.,_____,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 194-кс
2. Строк подання здобувачем роботи___03.02.2024_____
3. Вихідні дані до роботи цільовий продукт: метаболіти мікроміцетів, об'єм ферментера - 1 м^3, коефіцієнт заповнення – 0,5_____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)_ статини - гіполіпідемічні препарати; технологічні особливості одержання статинів; техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу (лз); техніко-економічне обгрунтування; обгрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми одержання ЛЗ; підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях; специфікація обладнання; опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ; контроль виробництва субстанції для лз_____
5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ формату А2 – 1 аркуш, апаратурна схема післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ формату А2 – 1 аркуш_____

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____06 листопада 2023 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Статини - гіполіпідемічні препарати	07.11.21 – 11.11.21	
2.	Технологічні особливості одержання статинів	12.11.21 – 22.11.21	
3.	Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу (лз)	23.11.21 – 30.1.21	
4.	Техніко-економічне обгрунтування; обгрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми одержання лз	01.12.21 – 12.12.21	
5.	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	13.12.21 – 20.12.21	
6.	Специфікація обладнання	21.12.21 – 26.12.21	
7.	Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання лз	27.12.21 – 02.01.22	
8.	Контроль виробництва субстанції для лз	03.01.22 – 10.01.22	
9.	Оформлення пояснювальної записки	11.01.22 – 16.01.22	
10.	Виконання графічної частини проекту	17.01.22 – 24.01.22	

Здобувач _____ _____Юлія ДИМИЦЬКА___
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ ____Віктор СТАБНІКОВ___
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Здоров'я серцево-судинної системи є однією з ключових складових загального здоров'я людини. З огляду на зростання захворювань серця та високий рівень холестерину у сучасному суспільстві, виникає необхідність у розробці ефективних та безпечних методів зниження холестерину.

Одним із потенційно обіцяючих напрямків досліджень є використання сполук грибного походження для зниження рівня холестерину. Гриби є природними джерелами багатьох біологічно активних сполук, серед яких можуть бути ті, що впливають на обмін холестерину в організмі.

Мета даного дослідження полягає в докладному аналізі ідентифікації та характеристики сполук грибного походження, які можуть впливати на рівень холестерину у людини. Розглядається біологічна активність грибів та їхній вплив на метаболізм холестерину в організмі.

На основі аналізу та порівняння потенційних продуцентів ловастатину, складу поживних середовищ для їх культивування обрано штам *A. terreus* 4, який порівняно з іншими штамами є найвигіднішим при масштабному виробництві препарату. Розрахована потужність його виробництва становить 15,8 $м^3$ культуральної рідини або 140 кг статину за рік

Дипломна робота викладена на 101 стр. друкованого тексту, містить 7 таблиць, 5 рисунків і складається з вступу, дев’яти розділів, списку використаної літератури (140 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *A. terreus*, ловастатин, технологічна схема, допоміжні роботи, виробничий процес, поживне середовище, біологічний агент, статини, холестерин.

ABSTRACT

The health of the cardiovascular system is one of the key components of overall human health. Given the increase in heart disease and high cholesterol levels in modern society, there is a need to develop effective and safe methods of lowering cholesterol. One potentially promising area of research is the use of compounds of mushroom origin to lower cholesterol. Mushrooms are natural sources of many biologically active compounds, including those that affect cholesterol metabolism in the body. The purpose of this study is a detailed analysis of the identification and characterization of compounds of mushroom origin that can affect cholesterol levels in humans.

The biological activity of mushrooms and their influence on cholesterol metabolism in the body are considered. Based on the analysis and comparison of potential producers of lovastatin, the composition of nutrient media for their cultivation, the *A. terreus* 4 strain was chosen, which, compared to other strains, is the most profitable for large-scale production of the drug. The estimated capacity of its production is 15.8 m3 of culture liquid or 140 kg of statin per year

The thesis is laid out on 101 pages of printed text, contains 7 tables, 5 figures and consists of an introduction, nine chapters, a list of used literature (140 sources) and a graphic part (2 drawings in A1 format).

Key words: *A. terreus*, lovastatin, technological scheme, auxiliary works, production process, nutrient medium, biological agent, statins, cholesterol

ВСТУП…… 7
РОЗДІЛ 1. СТАТИНИ - ГІПОЛІПІДЕМІЧНІ ПРЕПАРАТИ……9
1.1. Відкриття та загальна характеристика статинів…….9
1.2. Фармакологічна дія статинів……...…...11
1.3. Структура статинів…….....…... 14
1.4. Нові терапевтичні ефекти статинів……...
16
РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ СТАТИНІВ…….....… 18
2.1. Біотехнологічне виробництво статинів……. 18
2.2. Морфологія грибів, конфігурації реактора та стратегії живлення……..19
2.3. Симвастатин……...……...….. 21
2.3.1. Впровадження зеленої хімії для синтезу симвастатину……..… 23
2.4. Ловастатин……... 24
2.4.1. Впровадження зеленої хімії для синтезу ловастатину …….. 31
2.5. Мевастатин……...… 31
2.6. Правастатин …… 33
2.6.1.Стратегія додавання джерел вуглецю …….. 36
2.6.2. Періодичне додавання компактину ……. 36
2.7. Генетичні маніпуляції для підвищення продукції статинів ……..… 36
2.7.1. Генетичні маніпуляції в нитчастих грибах для виробництва статинів… 37
2.8. Біоконверсія статинів …… 39
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ)…… ……. 41
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ на основі обраної субстанції, галузей використання, потреби у ЛЗ ……..…. 42
3.1.1. Фармакологічні властивості ловастатину……42
3.1.2. Галузі використання ловастатину …….….. 43
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ……..… 47
4.1 Потреба у цільовому продукті ……..…. 47
4.2. Розрахунок річної потужності виробництва ловастатину ……..... 48
4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і об’єму ферментера …… 49
4.4. Матбаланс на серію ЛЗ ……..…. 52
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ……..…..... 54
5.1. Обгрунтування вибору біологічного агента …… 54

5.2. Обґрунтування етапів виділення та очистки субстанції для одержання ловастатину……..…. 59
5.2.1. Обґрунтування вибору способу відділення біомаси……..… 59
5.2.2. Обґрунтування способу подрібнення ……..…61
5.2.3. Обґрунтування процесу екстрагування за допомогою ацетонітрилу …..62
5.2.4. Обґрунтування способу фільтрування екстракту ……..… 63
5.2.5. Обґрунтування вибору процесу упарювання ……..... 64
5.2.6. Обґрунтування вибору процесу кристалізації ……..… 65
5.2.7. Обґрунтування вибору відділення кристалів …… 66
5.3. Обґрунтування форми випуску ЛЗ ……..…… 67
5.4. Обґрунтування вибору первинної упаковки ЛЗ ……..…….. 68
5.5. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря)……..….. 69
5.6. Обґрунтування вибору підготовки води ……..……. 73
РОЗДІЛ 6. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ ……..… 77
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ……..... 79
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ……... 81
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ ……..... 85
9.1. Показники якості готового продукту ……..….. 85
9.1.1. Мікробіолгічний контроль сухого ловастатину ……..... 85
9.1.2.Визначення концентрації ловастатину ……..… 85
9.1.3. Контроль ваги продукту в одному пакеті (маса брутто) ……... 86
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ …… 87
ДОДАТКИ……... 104

ВСТУП

Високий рівень холестерину — досить поширений стан у всьому світі. Саме ця проблема є головним винуватцем виникнення багатьох серцево-судинних захворювань, які можуть бути небезпечними для життя.

Серцево-судинні захворювання (ССЗ) наразі є однією з найважливіших проблем охорони здоров'я у світі, спричиняючи одну третину всіх смертей у світі (17,3 мільйона смертей на рік) (Benjamin та ін., 2017). На початку 20 століття холестеринові бляшки були виявлені в коронарних артеріях пацієнтів, які померли від стенокардії (Herrick, 1983).

Статини є основою первинної та вторинної профілактики ССЗ у людей з високим рівнем холестерину. Постійне тривале оптимальне лікування статинами з раннього віку може ефективно запобігти ССЗ протягом десятиліть життя (Nordestgaard та ін., 2013).

Незважаючи на свою коротку історію (менше сорока років), було проведено багато досліджень статинів і сотень тисяч пацієнтів, які приймали ці препарати. Це дало початок широким знанням про характеристики цих препаратів, призвело до синтезу нових речовин, які покращують властивості вищевказаних статинів; в цьому напрямку частина фармацевтичних досліджень все ще рухається. Тим не менш, це також призвело до широкого задоволення реального токсикологічного профілю для кожної речовини (De Angelis, 2004).

Слід зазначити, що терапія статинами показала також свою доцільність при цілій низці інших станів та захворювань: жовчнокам'яна хвороба, аритмії, артрити, деменція, але доказова база поки що недостатня для винесення загальних рекомендацій (Коваленко, Лутай, Сіренко & Сичова, 2016).

Тема дипломного проєкту полягає в дослідженні сполук грибного походження для їх потенційного використання у зниженні рівня холестерину. Це стає особливо актуальним у контексті зростаючого інтересу до природних джерел функціональних сполук та підходів до підтримання серцево-судинного здоров'я.

Мета дослідження полягає у вивченні властивостей грибів та їх можливого впливу на рівень холестерину, а також в оцінці можливих ефектів на загальне здоров'я. Крім того, проект передбачає розробку природних препаратів на основі отриманих результатів для підтримання здоров'я серцево-судинної системи.

РОЗДІЛ 1. СТАТИНИ - ГІПОЛІПІДЕМІЧНІ ПРЕПАРАТИ

1.1. Відкриття та загальна характеристика статинів

Відкриття статинів почалося з демонстрації того, що певні грибкові метаболіти знижують синтез холестерину in vitro шляхом пригнічення 3-гідрокси-3-метилглутарил (ГМГ)–коензим А редуктази, ферменту, що обмежує швидкість синтезу холестерину в печінці. Перший експеримент був проведений у дослідницьких лабораторіях бродіння Sankyo Company, Ltd, японського фармацевтичного виробника, і був опублікований у 1976 році (Endo & Tanzawa, 1976). Використані метаболіти, названі ML-236A та ML-236B, були виділені з культур *Penicillium citrinum*. Сполуки були отримані в лактонній і кислотній формах, і їх ефект перевірений на ГМГ-КоА-редуктазі, отриманій з мікросом печінки щурів. Натрієва сіль ML-236B була найефективнішою з 4-х сполук. ML-236B у діапазоні дозування 50–150 мг/добу використовувався тією ж групою для лікування групи з 11 пацієнтів з первинною гіперхолестеринемією (Yamamoto, Sudo & Endo, 1980). Дані були надруковані в березні 1980 р. і показали, що рівень холестерину в сироватці знизився на в середньому на 27% (діапазон 11%–37%) через 4–8 тижнів.

Робота, виконана в Японії, була продовжена через кілька років дослідниками з дослідницьких лабораторій Merck Sharp & Dohme у Сполучених Штатах, використовуючи штам *Aspergillus terreus*, отриманий за допомогою іспанської програми ізоляції ґрунту (Manu & Rogozea, 2016).

Після цього відкриття були докладені енергійні зусилля для розробки нових статинів, що призвело до впровадження восьми різновидів статинів на сьогоднішній день. Хоча ці статини зазвичай мають структуру, подібну до ГМГ-КоА, їхній холестерин-знижуючий ефект і фармакокінетика відрізняються (Morofuji та ін., 2021).

Інгібітори гідроксиметилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) редуктази або статини знижують концентрацію загального холестерину, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) і тригліцеридів, одночасно збільшуючи концентрації ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ). Схвалені FDA статини включають аторвастатин, розувастатин, симвастатин, правастатин, флувастатин, ловастатин і пітавастатин (O'Malley та ін., 2020). Лікарі давно використовують статини для лікування гіперхолестеринемії, гіперліпопротеїнемії та гіпертригліцеридемії як доповнення до дієти та фізичних вправ. Ці засоби використовуються в основному для первинної та вторинної профілактики ішемічної хвороби серця. Схвалені FDA показання дещо відрізняються між ліками цього класу.

До того, як статини почали комерціалізувати, проводилися клінічні випробування, які показували, що різноманітні методи зниження рівня холестерину, такі як операція шунтування, дієти або ліки, що знижують рівень холестерину, можуть зменшити частоту інфаркту міокарда та коронарної смерті. Крім того, величина цього зниження була пропорційна ступеню зниження холестерину (Pinal-Fernandez, Casal-Dominguez & Mammen, 2018).

Статини мають потенціал як протигрибкові засоби; однак вони навряд чи будуть конкурувати з азолами та препаратами, які можуть ефективно та вибірково впливати на ергостеролин та його біосинтез при інвазивних грибкових інфекціях. Максимальна концентрація препарату в плазмі становить 10-40 нг/мл, що може бути досягнуто в клінічних дослідженнях. Кілька досліджень повідомляли про вищі значення МІК статинів проти видів грибів у діапазоні від 4 мкг/мл до значення понад 256 мкг/мл. Значення MIC для

пригнічення росту *A. fumigatus* було виявлено 58 мкг/мл (10 мкМ) і 0,4 мкг/мл (1 мкМ) у випадку аторвастатину та симвастатину відповідно. Ловастатин і симвастатин мають здатність пригнічувати ріст *Aspergillus* spp. але в концентраціях, які є токсичними для клітин людини.

Вивчали синергічні протигрибкові ефекти статинів і азолів *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32051 і *C. utilis* Pr $_{1–2}$. Статини підвищували активність азолів у їх субінгібіторних концентраціях (SIC) проти штамів дріжджів. Таким чином, спільне застосування цих протигрибкових препаратів може збільшити ефективність і зменшити необхідні дози азолів для лікування грибків, особливо у випадках рефрактерних інфекцій (Cabral, Figueroa & Fariña, 2013).

Варто також відзначити, що форми ловастатину та симвастатину з відкритим кільцем пригнічують ріст *A. terreus*, хоча виробництво ловастатину не становить проблеми для *A. terreus* , оскільки він вивільняється поза клітиною у вигляді активного бета-гідроксилу. формі, можливо, як захисний механізм під час вторинного метаболізму. Для якісного скринінгу продуцентів ловастатину було проведено біотести. Оскільки ловастатин має здатність діяти як протигрибковий агент, були вивчені біотести інгібування росту дріжджів і біотести дифузії в агарі з використанням *Neurospora crassa* MTCC-790 як тестового штаму. Неочищені екстракти ізолятів грибів завантажують у лунки агару, а етилацетат використовують як контроль. Відбираються штами, що демонструють чітку зону інгібування (Upendra, Khandelwal, Amiri, Shwetha & Ausim, 2013).

1.2. Фармакологічна дія статинів

Холестерин є важливим компонентом для підтримки життя, слугуючи основним інгредієнтом для клітинних мембран, стероїдних гормонів і жовчних кислот. Він поділяється на екзогенний холестерин, який надходить із їжею, та ендогенний холестерин, який переважно синтезується в печінці, причому останній переважає в організмі людини. Шлях біосинтезу холестерину включає

багатоступінчасті реакції, де етапом, що визначає швидкість, є реакція синтезу мевалонату з ГМГ-КоА. Цей етап, що визначає швидкість, каталізується ГМГ-КоА-редуктазою, експресія якої підлягає контролю за зворотним зв'язком вмістом внутрішньоклітинного холестерину. Гомеостаз внутрішньоклітинного холестерину підтримується через цей контроль зворотного зв’язку (Mayengbam, Singh, Pillai & Bhat, 2021). Статини є незамінними компонентами для лікування дисліпідемії та профілактики серцево-судинних захворювань завдяки їх здатності пригнічувати біосинтез холестерину шляхом інгібування ГМГ-КоА-редуктази.

Статини є селективним конкурентним інгібітором гідроксиметилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) редуктази, ферменту, відповідального за перетворення ГМГ-КоА на мевалонат у процесі синтезу холестерину. Зменшуючи синтез холестерину в печінці, відбувається активація рецепторів ЛПНЩ і збільшення поглинання печінкою холестерину ЛПНЩ із циркуляції. Лікування статинами знижує швидкість вироблення в печінці апо B100, що містить ліпопротеїни, що призводить до зниження концентрації як холестерину, так і тригліцеридів. Реакція на ліки також може відрізнятися залежно від генетичних факторів, таких як АТФ-зв’язуюча касета G2, гени ліпопротеїну (a) та apo E (Drugs and Lactation Database (LactMed), 2018). Ген RhoA може відігравати важливу роль у відповіді статинів на LDL-C (Sirtori CR, 2014).

Механізм дії статинів заснований на зв’язуванні молекул з активним центром ферменту, таким чином перешкоджаючи зв’язуванню субстрату і, отже, пригнічуючи наступні етапи біосинтезу холестерину. Структурна кристалографія комплексу статин-фермент показала, що розувастатин має надзв’язування через водневий зв’язок у поєднанні з полярною взаємодією, унікальною для розувастатину; ці варіації можуть пояснити домінуючу плейотропну активність певних статинів порівняно з іншими (Zeina, Ibrahim, Abdulla & Marwan, 2020).

Деякі статини є ліпофільними, включаючи ловастатин, аторвастатин, симвастатин і флувастатин, тоді як і розувастатин, і правастатин є гідрофільними, оскільки вони містять метансульфонамідну та гідроксильну частину відповідно (McTaggart та ін., 2001).

Клінічно застосовувані статини включають ліпофільний симвастатин, аторвастатин, пітавастатин і флувастатин, а також гідрофільні правастатин і розувастатин. Тоді як ліпофільні статини всмоктуються в клітини через пасив дифузії гідрофільним статинам потрібні транспортні білки органічних аніонів (OATP), щоб всмоктуватися в печінці. За винятком флувастатину, статини служать субстратами для OATP1B1, поліморфізм гена якого, як повідомляється, відповідає за різну фармакокінетику статинів.

Як правило, статини добре переносяться і рідко викликають серйозні побічні ефекти. Однак однією з побічних реакцій, заслуговуючих на увагу, є міопатія, яка може прогресувати до фатального рабдоміолізу (Sirtori, 2014). Таким чином, при застосуванні високих доз статинів для лікування або при одночасному застосуванні з препаратами, які інгібують CYP або OATP, слід бути обережними, щоб уникнути підвищеного ризику побічних реакцій.

Численні дослідження показали пригнічувальну дію статинів на серцево-судинні захворювання. Деякі з цих досліджень показали, що пригнічувальна дія статинів на серцево-судинні захворювання не обов’язково корелює з ефектом зниження рівня холестерину; отже, також необхідно звернути увагу на ефекти статинів, крім ефекту зниження холестерину (плейотропні ефекти) (Oesterle, Laufs & Liao, 2017). Такі плейотропні ефекти включають серцево-судинні ефекти, такі як антиоксидантний, антитромботичний і функціональний вплив на ендотеліальні клітини, а також несерцево-судинні ефекти, такі як протизапальні та антиканцерогенні ефекти (Kavalipati, Shah, Ramakrishan & Vasnawala, 2015).

Статини пригнічують синтез ізопреноїдних проміжних продуктів, необхідних для активації внутрішньоклітинних/сигнальних білків (Ras, Rho,

Rab, Rac, Ral або Rap). Ізопреноїди є критично важливими молекулами для підтримки функцій клітини, таких як транспорт електронів і функціональна регуляція білка. Активність сімейств Rho і Ras низькомолекулярних G-білків (малих G-білків) модулюється через посттрансляційну модифікацію проміжними метаболітами біосинтезу ізопреноїдів, такими як фарнезилпірофосфат (FPP) і геранілгеранілпірофосфат (GGPP) (Reddy, Raut, Seifert & Hynds, 2020).

Таким чином, статини пригнічують не тільки синтез холестерину, але й ізопреноїдів. Крім того, вони сприяють стабільності нальоту та запобігають агрегації тромбоцитів. Цей плейотропний ефект є ефектом класу статинів і демонструється всіма статинами. Результати дослідження COSMOS (дослідження коронарного атеросклерозу, що вимірює вплив розувастатину за допомогою внутрішньосудинного ультразвуку у японських суб'єктів) показали, що у пацієнтів, які отримували розувастатин, спостерігалося значне зменшення об'єму бляшок незалежно від зниження холестерину ЛПНЩ (Kavalipati, Shah, Ramakrishan & Vasnawala, 2015).

1.3. Структура статинів

Статини поділяються на класи на основі їх синтезу або структури. У випадку синтезу існують три класи: природний, напівсинтетичний або синтетичний (Murphy, Deplazes, Cranfield & Garcia, 2020). Природні статини виробляються шляхом ферментації грибів і включають ловастатин, компактин і правастатин. Напівсинтетичні статини, включаючи симвастатин, синтезуються алкілуванням ловастатину, замінюючи фрагмент 2-метилбутирату в положенні C-8 нафталінового кільця на 2,2-диметилбутират. Синтетичні статини синтезуються хімічним шляхом і мають лише спільний фрагмент фармакофору дигідроксигептанової кислоти (подібний до ГМГ-КоА), який імітує субстрат ГМГ-КоА у зв'язуванні ГМГР. Синтетичні статини включають аторвастатин, церивастатин, розувастатин, флувастатин і пітавастатин. Усі форми статинів

можуть оборотно метаболізуватися шляхом лактонізації (Murphy, Deplazes, Cranfield & Garcia, 2020).

Структурна класифікація базується на типі кільцевої структури статину (рис 1). Статини I типу, включаючи ловастатин, компактин і симвастатин, містять нафталінове кільце. Усі статини типу II містять фторфенільну групу та серію гідрофобних кільцевих структур, які ковалентно приєднані до ГМГ-КоА-подібного фрагмента, зокрема, пірол у аторвастатині, піридин у церивастатині, піримідин у розувастатині, індол у флувастатині та хінолін у пітавастатині. Ці гідрофобні кільцеві структури імітують субстрат ГМГ-КоА і важливі для зв'язування з ГМГР. Бічні групи, що відгалужуються від кілець, модулюють розчинність/гідрофільність лікарського засобу та впливають на його фармакокінетику, зокрема, на бутирилову групу в типі I та фторфеніл і ізопропіл у типі II (Gazzerro та ін., 2012).

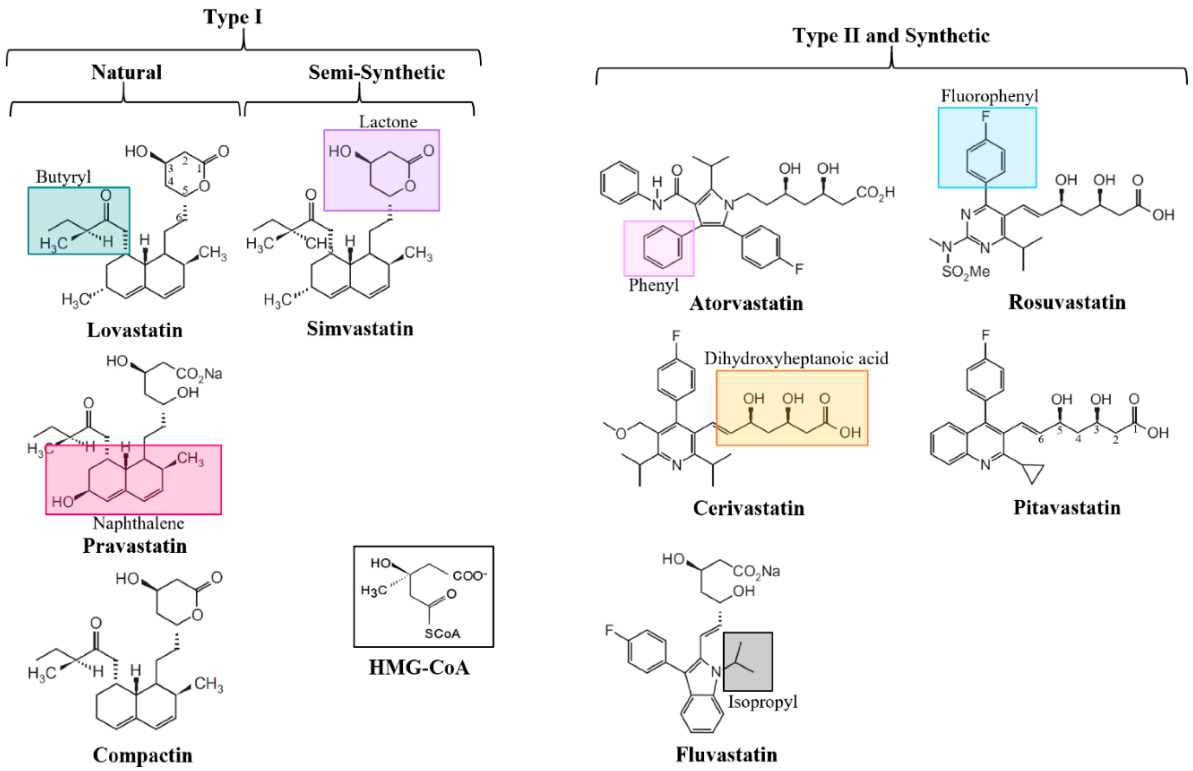


Рис.2. Структурна класифікація статинів

Активна форма ловастатину перетворюється на неактивну форму лактону шляхом екстракції розчинником середовища бродіння, яка є менш ліпофільною

порівняно з гідроксильною формою (Lisec, Radež & Žilnik, 2012). Ловастатин також має здатність далі перетворюватися на метиловий ефір, якщо в якості розчинника використовується метанол. Це створює проблему під час скринінгу високого рівня виробництва, оскільки біологічні аналізи стають більш складними через існування різних хімічних форм. Таким чином, існує довіра до більш трудомісткого хімічного скринінгу для визначення рівнів ловастатину в культурах, екстрактах і фракціях (Subhan, Faryal & Macreadie, 2016).

Флувастатин є першим повністю синтетичним статином, потім був синтетичний аторвастатин. Також зазначається, що і симвастатин, і правастатин є, відповідно, метильними та гідроксильними похідними ловастатину, і, отже, усі вони структурно споріднені один з одним. Нарешті, була описана та схвалена нова пролонгована або повільно вивільняюча форма ловастатину під назвою альтокор (або альтопрев), але пізніше її було вилучено через серйозні побічні ефекти з летальним результатом (Basak, A. & Basak, S., 2020).

1.4. Нові терапевтичні ефекти статинів

Холестерин є важливим компонентом для підтримки життя, слугуючи основним інгредієнтом для клітинних мембран, стероїдних гормонів і жовчних кислот. Він поділяється на екзогенний холестерин, який надходить із їжею, та ендогенний холестерин, який переважно синтезується в печінці, причому останній переважає в організмі людини.

Шлях біосинтезу холестерину включає багатоступінчасті реакції, де етапом, що визначає швидкість, є реакція синтезу мевалонату з ГМГ-КоА. Ця стадія, що визначає швидкість, каталізується ГМГ-КоА-редуктазою, експресія якої підлягає контролю за зворотним зв'язком вмістом внутрішньоклітинного холестерину. Гомеостаз внутрішньоклітинного холестерину підтримується через цей контроль зворотного зв’язку (Mayengbam, Singh, Pillai & Bhat, 2021).

Як згадувалося раніше, ці препарати діють шляхом оборотного та конкурентного інгібування біовідновлення S-3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА

(ГМГ-КоА), лімітуючої стадії мевалонатного шляху в біосинтезі холестерину, оскільки хімічної схожості з мевалоніл-КоА, проміжним продуктом, отриманим після першого відновлення ГМГ-КоА. Крім того, нещодавно отримано численні докази того, що статини — це щось більше, ніж прості гіполіпідемічні препарати (Bifulco, 2014; Ferri, 2014).

Фактично, велика кількість сучасних експериментальних даних підтвердила, що статини можуть проявляти багато різних потенційно сприятливих терапевтичних ефектів за допомогою кількох механізмів, істотно не пов'язаних з метаболізмом холестерину. Ці так звані плейотропні ефекти можна пояснити їх здатністю запобігати перетворенню ГМГ-КоА на R-мевалонат, що призводить до супутнього інгібування подальшого біосинтезу холестерину, а також численних ізопреноїдних метаболітів, таких як геранілгеранілпірофосфат (ГГПФ) або фарнезилпірофосфат (ФПФ) (Hoyos, Pace & Alcántara, 2019).

Примітно, що деякі сприятливі ефекти статинів проявлялися до зниження рівня холестерину, і можна припустити, що ці ефекти, залежні від посилення експресії та/або активності eNOS, призводять до зниження активації тромбоцитів, ослаблення адгезії, експресії молекул, зниження вироблення запальних цитокінів і збільшення активних форм кисню (АФК). Таким чином, плейотропні ефекти статинів включають зниження гемостазу шляхом зменшення активації тромбоцитів і прокоагуляційного каскаду, посилення фібринолізу та антикоагулянтного каскаду, поліпшення функції ендотелію, підвищення біодоступності NO, а також антиоксидантну, імуномодулюючу та протизапальну дії та стабілізацію атеросклеротичних бляшок (Malfitano та ін., 2014; Liao & Laufs, 2005; Mihos, Salas & Santana, 2010; Yanuck, Mihos & Santana, 2012; Mihos, Artola & Santana, 2012; Barone, Di Domenico & Butterfield, 2014).

Таким чином, терапевтичні ефекти статинів сьогодні присутні в таких сферах, як здоров’я серцево-судинної системи, регуляція імунної системи, протизапальні та імуносупресивні властивості, профілактика та лікування сепсису, лікування аутоімунних захворювань, остеопорозу, ниркових та неврологічних розладів і навіть при лікуванні раку.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ СТАТИНІВ

2.1. Біотехнологічне виробництво статинів

На біотехнологічне виробництво статинів впливає кілька змінних, таких як вибір моделі ферментації, вибір джерел вуглецю та азоту в середовищі, аерація, pH та методи екстракції/очищення. Однак, навіть з такою кількістю змінних, цей процес виявився кращим за хімічне виробництво. Навіть біотехнологічне виробництво вже є великим проривом, у хімічних методах, завжди важливо розробляти нові форми та стратегії виробництва цих ліків.

Скринінг мікроорганізмів на продукування сполук-інгібіторів холестерину є важливим кроком, і його проводили для отримання кращого виробництва. Природні статини синтезуються головним чином штамами *A. terreus* та різними видами роду *Monascus*, а також іншими родами нитчастих грибів, такими як *Penicillium*, *Doratomyces*, *Eupenicillium , Gymnoascus, Hypomyces, Paecilomyces, Phoma, Trichoderma* та *Pleorotus*. Незважаючи на переважання родів грибів, у літературі повідомляють про види *actinimicetos* (*Nocardia spp*. і *Streptomyces spp*.), здатні продукувати статини.

Для обраних мікроорганізмів принципове значення має тип бродіння. Сполука-інгібітор ферменту, яка впливає на синтез холестерину, була відкрита під час зануреної ферментації (SmF) грибом *Penicillium citrinum*, вирощеним у солодовому екстракті, декстрозі та пептонному базовому середовищі. Результати цього дослідження базуються на використанні статинів у виробництві статинів шляхом модифікації складу культурального середовища або оптимізації параметрів процесу, таких як температура, pH і перемішування (Mouafi, Abo

Elsoud & Moharam, 2016), або біотрансформації молекули (Syed & Ponnusamy, 2018). Заглиблене бродіння є способом виробництва, який використовується фармацевтичною промисловістю донині, оскільки це найдешевший і найшвидший спосіб отримання цих сполук.

Незважаючи на те, що статини виробляються зануреним бродінням, цей процес має обмеження, такі як виділення в реакційне середовище речовин, токсичних для мікроорганізму-продуцента. Таким чином, альтернативою, яка була вивчена, є виробництво статинів шляхом твердофазної ферментації (SSF). Декілька авторів повідомляють, що хоча SSF займає більше часу та коштує більше, це може бути стратегією збільшення виробництва цікавої сполуки через фізіологію твердого середовища (Suraya та ін., 2018).

2.2. Морфологія грибів, конфігурації реактора та стратегії живлення

Нещодавні дослідження заглибленої ферментації були зосереджені на морфології грибів та її зв’язку з виходом статинів, роллю біореактора, реологією бульйону, співвідношенням C/N, насиченням киснем тощо, причому покращення виходу статинів було виявлено шляхом модифікації цих факторів.

Реактори, які використовуються для досліджень виробництва компактину, були різноманітними за своєю природою з періодичним, періодичним і безперервним режимами роботи з використанням безперервного резервуара з перемішуванням, барботажної колони та біореакторів з ерліфтом. Морфологія організму є важливим визначальним фактором продуктивності, причому гранульована форма є кращою формою для виробництва статинів. Для виробництва ловастатину найбільш придатними були компактні та сильно зрізані гранули *A. terreus* із розміром ядра приблизно 0,85–1,05 мм (Wiewel та ін., 2018). Такі фактори, як швидкість перемішування та методи аерації, вплинули на морфологію гранул і реологію бульйону, що впливає на титри ловастатину *A. terreus* ATCC 20542. Висока швидкість перемішування призвела до зменшення розміру гранул (900 мкм), тоді як при нижчих швидкостях

перемішування гранули були більшого розміру (2500 мкм) і пухнастого характеру. Титри ловастатину були вищими при барботуванні киснем при меншій швидкості перемішування, що могло бути наслідком меншого пошкодження міцелію в поєднанні з кращою доступністю кисню. Нездатність менших гранул досягти високої продуктивності ловастатину навіть при збагаченні киснем свідчить про необхідність знайти баланс між інтенсивністю перемішування для достатнього перемішування без пошкодження гранул і насиченням киснем ферментаційного бульйону (Reis та ін., 2017).

Дослідження в 20-літровому біореакторі з барботажною колоною показали, що концентрація біомаси, а також розмір гранул впливають на реологію ферментаційного бульйону. Високі концентрації біомаси в умовах, багатих киснем, і помірна турбулентність призвели до збільшення виходу ловастатину. Коефіцієнт переносу кисню при бродінні цвілі, проведеному в барботажному реакторі, корелював зі швидкістю аерації, концентрацією біомаси та ефективною в’язкістю ферментаційного бульйону (Ribeiro та ін., 2017). Крім того, зростання гранульованої цвілі сприяло в реакторі з барботажною колоною, тоді як більш волокниста морфологія була отримана в біореакторі з мішалкою (Braga та ін., 2018). В'язкість і псевдопластична неньютонівська поведінка ферментаційного бульйону в ерліфтному біореакторі значною мірою залежали від концентрації біомаси та морфології клітин (Parihar, Guler & Brombacher, 2018).

Стратегії годування також використовувалися для покращення виробництва статинів. Стратегія живлення, що складається з трьох різних фаз: періодичного, періодичного з підживленням і напівбезперервного режиму із утриманням біомаси призвела до 50% збільшення швидкості виробництва ловастатину порівняно з періодичною ферментацією. Середовище, що використовувалося для живлення під час фаз періодичної підживлення та напівбезперервної фази, не містило джерела азоту (Braga та ін., 2018). У

пов’язаному дослідженні з використанням двоступеневої ферментації в режимі періодичної дії/розподілу з підживленням і напівбезперервного режиму, що складається з 96 годин періодичної фази/фази періодичної підживлення з повним живильним середовищем з подальшою напівбезперервною операцією з використанням середовищ без азоту та вуглецю спостерігалося збільшення на 315 % порівняно з періодичним культивуванням (Kaminska та ін., 2018). Так само було встановлено, що безперервний режим бродіння покращує виробництво порівняно з періодичним процесом. Реактори, які використовуються для досліджень, варіюються від реакторів періодичної дії з турбіною з плоскими лопатями до реакторів з ерліфтом і барботажних колонок.

У дослідженнях виробництва статинів використовували різноманітні харчові добавки, вибір добавок залежав від використовуваних мікробних штамів.

2.3. Симвастатин

Симвастатин — напівсинтетичний холестерин-знижуючий препарат і один із найбільш продаваних статинів у світі. В даний час промислове виробництво симвастатинової кислоти (SVA) є багатоетапним процесом, починаючи з натурального продукту ловастатину. З цієї причини існує значний інтерес до прямого виробництва симвастатину з мікробного хазяїна.

Симвастатин є одним із найважливіших препаратів для лікування гіперхолестеринемії, таким чином знижуючи ризик серцевих захворювань. Це другий найбільш продаваний препарат у Сполучених Штатах з продажами, що перевищують 5 мільярдів доларів. Цей препарат є результатом біотрансформації в молекулі ловастатину, яка утворюється в результаті метаболізму *A. terreus*. Синтез симвастатину ловастатином включає різні процеси, основний з яких залежить від грибкових ферментів (Rahim, Harith, Montoya & Abbas, 2017; Huang, Liang, Yang & Lu, 2017).

Основні процеси, які використовуються для перетворення ловастатину в симвастатин, відбуваються через гідроліз ловастатину за допомогою проміжної сполуки під назвою монаколін. Цей процес є ефективним, хоча він створює більше витрат і є більш трудомістким, оскільки і ловастатин, і симвастатин є антиліпеміками, які використовуються в лікуванні. Симвастатин приблизно в п’ять разів ефективніший за його попередник ловастатин при введенні в тій самій дозі, що виправдовує його використання (Neto та ін., 2019).

Перетворення монаколіну в симвастатин за допомогою α-диметилбутирилового тіоефіру залежить від одного з каталітичних ферментів класу Lov, що продукуються *A. terreus* (Bhargavi, Praveen, Anil Kumar & Savitha, 2018; Miranda та ін., 2014). Існує можливість прямого перетворення ловастатину в симвастатин без необхідності утворення монаколіну за допомогою чотирьох процесів, які передбачають додавання радикала н-бутиламіну та хлорату кремнію. Молекула ловастатину з додаванням кільця C_4H_9N, після чого молекула піддається обробці гідроксидом натрію, соляною кислотою та гідроксидом амонію, утворюючи ізомер симвастатину, який можна перетворити на комерційний симвастатин. На рис. (3) показано перетворення ловастатину в симвастатин за допомогою трьох процесів.

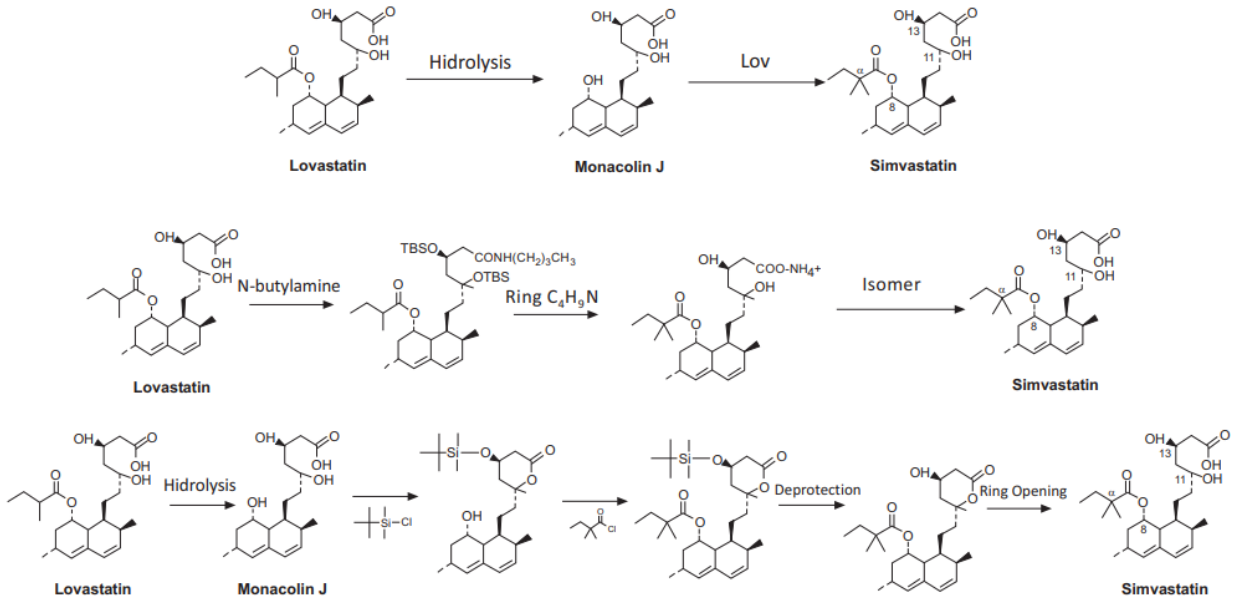


Рис. 3. Перетворення ловастатину в симвастатин

2.3.1. Впровадження зеленої хімії для синтезу симвастатину

Застосування екологічної хімії для синтезу симвастатину стало можливим, коли професор Ї Тан з Каліфорнійського університету в Лос-Анджелесі (США) розробив новий біоінженерний фермент і менш дорогу сировину. За допомогою цього методу його команда вперше виробила фермент під назвою ацилтрансфераза LovD шляхом клонування та використала його для великомасштабного виробництва симвастатину з ловастатину найбільш економічним і безпечним для навколишнього середовища способом. В основному метод складається з трьох простих етапів, як показано на рис. 4 (А), де ловастатин (1), отриманий шляхом ферментації, гідролізували з утворенням водорозчинної амонієвої солі триатомного спирту, відомого як монаколін J (1a). Потім цей триатомний спирт був селективно моноацилований у присутності рекомбінантного ферменту ацилтрансферази LovD у вторинній гідроксильній групі, розташованій у кільцевій системі декаліну. Для цієї реакції 2,2-диметилбутирил-S-метилмеркаптопропіонат (DMB-S-MMP) був розроблений як найбільш ефективний субстрат, який діє як донор ацилу для ферменту LovD.

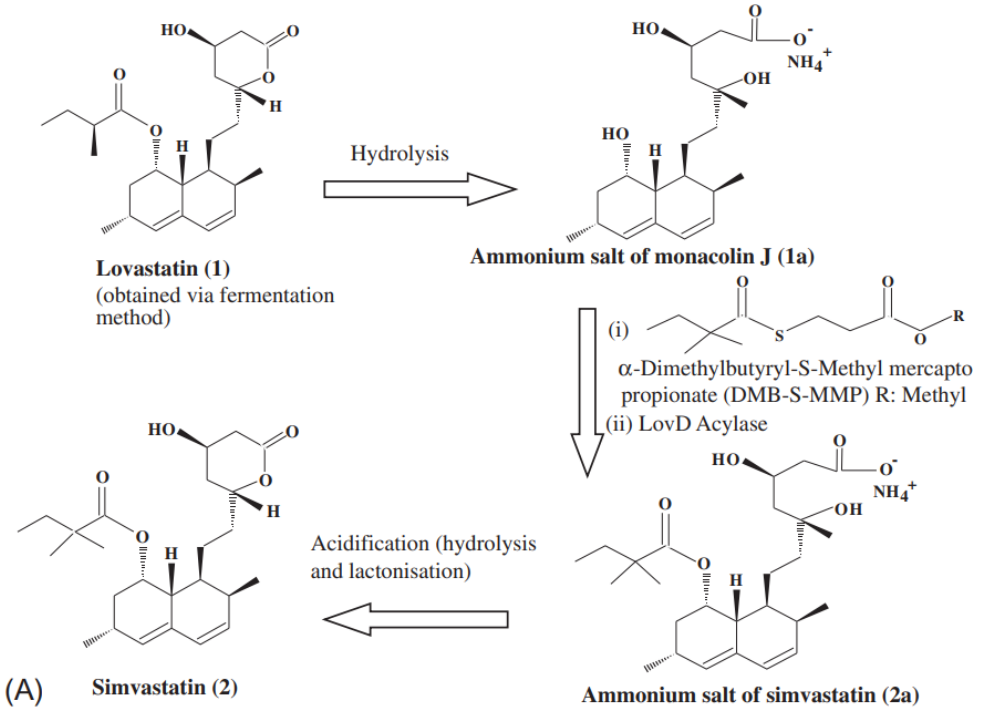
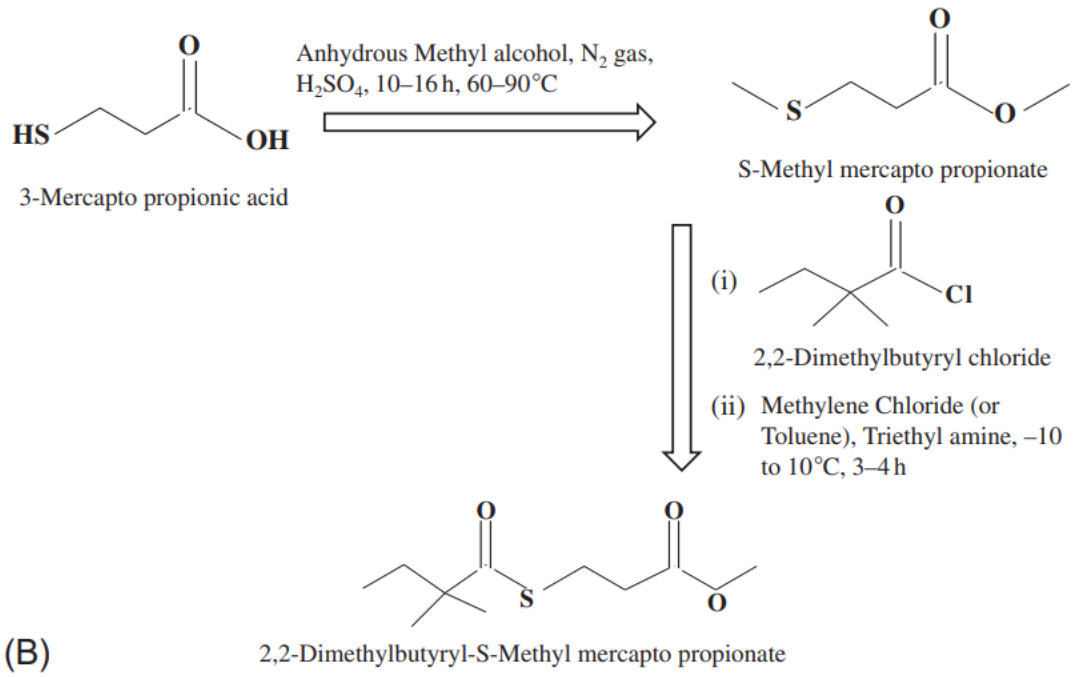


Рис. 4 (А). Зелений синтез симвастатину з ловастатину

Це призвело до утворення водорозчинної амонійної солі симвастатину (2а). Єдиним побічним продуктом цієї реакції є метил 3-меркаптопропіонова кислота, яку відновлюють і згодом переробляють для отримання додаткової кількості DMB-S-MMP. DMB-S-MMP легко синтезується у дві прості хімічні стадії, починаючи з 3-меркаптопропіонової кислоти, як описано на рис. 4 (В).



(B)

Рис. 4 (В). Хімічний синтез ацильного донора бічного ланцюга симвастатину, 2,2-диметилбутирил-S-метилмеркаптопропіонату (DMB-S-MMP)

Нарешті, (2а) підкислювали для гідролізу солі амонію. Отриману гідроксикислоту циклізували в тій самій реакції з утворенням шестичленного лактонного кільця, що призвело до симвастатину (2). Це стійкий енергоефективний і економічно ефективний зелений синтез симвастатину з мінімальним впливом на навколишнє середовище, оскільки виключає використання небезпечних хімічних речовин, таких як трет-бутилдиметилсилілхлорид, метилйодид і н-бутиллітій.

2.4. Ловастатин

Ловастатин зробив революцію в лікуванні гіперхолестеринемії. Ця сполука пригнічує біосинтез холестерину не тільки in vitro, а й in vivo у людей і тварин.

Ловастатин є потужним конкурентним інгібітором 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА-редуктази), ферменту, що обмежує біосинтез холестерину, що призводить до зниження холестерину ЛПНЩ у печінці. Останні дослідження також продемонстрували ефективність ловастатину при лікуванні деяких видів раку, хвороби Альцгеймера та остеопорозу (Gonyeau, 2005; Sparks, 2011; Hindler, Cleeland, Rivera & Collard, 2006). Повідомлялося, що багато видів грибів є продуцентами ловастатину, включаючи *Aspergillus terreus, Pleurotus ostreatus, Omphalotus olearius, Penicillium citrinum, Monascus ruber, Monascus purpureus, Paecilomyces viridis, Monascus pilosus, Monascus vitreus, Monascus pubigerus і Monascus paxi* (Lam & Okello, 2015) (як показано в Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Огляд гіпохолестеринемічних засобів, що продукуються грибами

Продуценти	**Література**
Ловастатин (монаколін J, мевінолін)	
Aspergillus terreus	(Manzoni & Rollini, 2002; Javed, Bukhari, Zovia & Meraj,2014; Atli & Yamac, 2012)
Pleurotus ostreatus	(Manzoni & Rollini, 2002; Lam & Okello, 2015; Alarcón & Aguila, 2006; Atli & Yamac, 2012)
Omphalotus olearius	(Manzoni & Rollini, 2002; Atli & Yamac, 2012)
Penicillium citrinum	(Manzoni & Rollini, 2002; Atli & Yamac, 2012)
Monascus ruber	(Huang, Liao & Li, 2018; Atli & Yamac, 2012; Zhang та ін., 2018)
Monascus purpureus	(Manzoni & Rollini, 2002; Pattanagul,

	Pinthong, Phianmongkhol & Tharatha, 2008)
Monascus pilosus	(Manzoni & Rollini, 2002, Lee S.S., Lee J.H. & Lee I., 2013)
Monascus vitreus	(Manzoni & Rollini, 2002)
Monascus pubigerus	(Manzoni & Rollini, 2002)
Monascus paxi	(Manzoni & Rollini, 2002)

Закінчення таблиці 2.1

Monascus sanguineus	(Dikshit, Tallapragada & Statistical, 2016)
Правастатин	
Aspergillus terreus	(Manzoni, Bergomi, Rollini & Cavazzoni, 1999)
Monascus paxi	(Manzoni & Rollini, 2002)
Penicillium chrysogenum	(McLean та ін., 2015)
Penicillium citrinum	(Seydametova, 2013; Seydametova, 2015)
Penicillium janthinellum	(Seydametova, 2013; Seydametova, 2015)
Eupenicillium brefeldianum	(Seydametova, 2013)
Мевастатин (компактин, ML-236B)	
Aspergillus terreus	(Syed & Rajasimman, 2015)
Penicillium cyclopium	(Bazaraa, Hamdy & Toledo,1988; Doss та ін., 1986)
Penicillium adametzioides	(Chung, Lee, Park & Seo, 2001)

Гриби роду *Monascus* розглядаються як перспективні джерела препаратів, що знижують рівень холестерину. Однак перед ефективним використанням *Monascus* важливо вибрати та контролювати умови бродіння, щоб отримати велику кількість речовин, необхідних як пігменти або ловастатин. Як і очікувалося, умови культивування мають великий вплив на виробництво ловастатину. Зокрема, джерела вітаміну B, кисню, pH і вуглецю є основними регуляторами (Rahim, Harith, Montoya & Abbas, 2017; Bizukojc & Ledakowicz,

2015; Atlı, Yamaç, Yıldız & Isikhuemnen, 2015; Atli & Yamac, 2012). Фактично, джерела вуглецю вважаються основний фактор у виробництві ловастатину.

Промисловий процес виробництва ловастатину розпочався в 1980 році з використанням *A. terreus* ATCC 20542. Розробка процесу передбачала аналіз різних параметрів бродіння. *A. terreus* ATCC 20542 також здатний біосинтезувати інші сполуки, які перешкоджають етапам очищення в промисловому виробництві. Переважним ко-метаболітом є бензофенон сулохрин, який утворився з попередника полікетиду. Цю сполуку було придушено підходами скринінгу та класичного мутагенезу, що сприяло збільшенню виробництва ловастатину в інших роботах. Іншим важливим ко-метаболітом є (+)-геодін, який також є побічним продуктом полікетидного шляху. Деякі дослідники досліджували стратегію зменшення утворення геодіну під час бродіння шляхом маніпулювання деякими параметрами, такими як аерація та контроль pH (Bizukojc & Ledakowicz, 2009). Ловастатин можна безпосередньо метилювати або деацилювати для синтезу симвастатин. Це включає одноетапний процес бродіння, а потім пряме хімічне перетворення.

Як правило, великомасштабне виробництво ловастатину було виконано методом заглибленої ферментації (SmF) шляхом зміни умов його фізичних параметрів харчування (Rahim, Harith, Montoya & Abbas, 2017). Виробництво ловастатину *A. terreus* здійснюється в основному за допомогою процесу SmF з використанням складного культурального середовища. Цей процес переважно використовується для великомасштабного промислового виробництва. При глибинній ферментації вихід пропорційний кількості біомаси, яку виробляє мікроорганізм. Однак висока щільність клітин забезпечує збільшення в'язкості. Були докладені зусилля для покращення виробництва ловастатину в SmF. Наприклад, виробництво ловастатину *A. terreus*, пов’язане з гранулами, знижувало в’язкість і збільшувало оксигенацію. Автори прийшли до висновку,

що склад і розмір наночастинок мають важливе значення для продуктивності гриба (Bizukojc & Gonciarz, 2015).

З іншого боку, увага дослідників була зосереджена на твердофазній ферментації (SSF), особливо через зниження витрат за рахунок використання альтернативних субстратів (сільськогосподарських залишків), меншої операційної складності (або під час обробки, або на стадіях потіку бродіння), нижче використання електроенергії та менше утворення стоків. Крім того, SSF дозволяє досягти більшої врожайності та стабільності продукту. У минулому SSF використовувався для виробництва промислових ферментів. Незважаючи на це, його використовують для виробництва вторинних метаболітів, таких як ловастатин (Rahim, Harith, Montoya & Abbas, 2017; Arora, Rani & Ghosh, 2018).

На вихід ловастатину також впливає додавання добавки до середовища росту, такі як лінолева кислота, бутиролактон, додекан і ацетат натрію. Ці добавки визначені як мікроелементи, оскільки вони найкраще поводяться при низьких концентраціях через те, що вони безпосередньо включаються в певний шлях або шляхом діючи як активатор ферменту. Мінеральні добавки є необхідний для виробництва ловастатину. Виробництво ловастатину залежить від різних фізико-поживних параметрів було добре задокументовано. Панда та ін. (Sayyad, Panda, Javed & Ali, 2007) порівняно додавання KH_2PO_4 і $FeSO_4$ (у поєднанні з декстрозою) до додавання NH_4Cl, $MgSO_4$ та NaCl у середовище, інокульоване *M. purpureus* 369. Автори спостерігали краще виробництва при використанні NH_4Cl, $MgSO_4$ і NaCl.

У деяких дослідженнях було представлено інформацію про виробництво ловастатину зі стічних вод обробки саго (SWW) під час зануреної ферментації з використанням олійних грибкових штамів *A. terreus* KPR12 і *A. caespitosus* ASEF14.

У цьому дослідженні виготовляли ловастатин за допомогою SWW під SmF, використовуючи штами олійних грибів *A. caespitosus* ASEF14 і *A.*

terreus KPR12. Спочатку бродіння проводилося протягом 6 днів. Після екстракції ловастатину з бульйону SM і SWW (позаклітинного) і міцелію грибів (внутрішньоклітинного) його підкислювали і лактонізували 1% трифтороцтовою кислотою. Цей процес може перетворити кислотну форму ловастатину в лактонну.

Застосування SWW включає біогаз (Elaiyaraju & Partha, 2012; Sangeetha & Sivakumar, 2016), водень (Amorim, Alves, Martins & Amorim, 2014; Khongkliang, Kongjan, Utarapichat, Reungsang & Sompong, 2017) виробництво мікробних ліпідів і біодизеля з використанням олійних дріжджів і грибів. З цих стічних вод для виробництва біодизеля з одночасним видаленням забруднюючих речовин раніше було виділено декілька олійних грибів та дріжджів (Sivakumar, Kiruthika & Naganandhini, 2019; Thangavelu, Sundararaju, Srinivasan, Muniraj & Uthandi, 2020; Thangavelu, Sundararaju, Srinivasan & Uthandi, 2021; Ashika, Kiruthika, Ashokkumar, Suraj & Uthandi, 2017). Крім того, деякі гіпермаслянисті гриби, такі як *A. terreus* KPR12 і *A. caespitosus* ASEF14 накопичують понад 20% ліпідів від їх сухої маси (Naganandhini, Thangavelu, Sekar & Uthandi, 2021).

Ловастатин, що продукується двома різними штамами грибів, вирощеними в SM і SWW, кількісно визначали за допомогою ВЕРХ. Час утримування (5,124) першого піку для обох грибкових екстрактів був подібним до стандартного ловастатину, а поява інших піків у зразках могла бути пов’язана з наявністю домішок або неідентифікованих сполук, утворених під час процесу ферментації. Концентрації ловастатину у внутрішньо- та позаклітинних фракціях KPR12, вирощених у SM, становили 117,93 та 883,28 мг/л відповідно; однак у SWW вихід ловастатину становив 142,23 і 429,98 мг/л відповідно. Крім того, концентрації ловастатину у внутрішньо- та позаклітинних фракціях ASEF14, вирощених у SM, становили 7,64 та 2,94 мг/л.$^{-1}$, а в SWW вони становили 13,57 і 0,62 мг/л $^{-1}$ відповідно. Результати показали, що штам грибів KPR12 перевершує ASEF14 щодо внутрішньо- та

позаклітинних фракцій, незалежно від SM та SWW. Таким чином, подальше експериментальне дослідження було зосереджено лише на грибі KPR12 з високим вмістом ловастатину.

Грибкові штами, вирощені на синтетичному субстратному середовищі на основі крохмалю, можуть секретувати велику кількість ловастатину у вигляді позаклітинної фракції. У цьому дослідженні спостерігалося збільшення в 2,04 раза і зниження в 1,2 раза позаклітинних і внутрішньоклітинних концентрацій ловастатину за KPR12 у SM порівняно з SWW відповідно. Цю нижчу секрецію можна пояснити межами опору масопередачі в SWW (Koroglu, Yoruklu, Demir & Ozkaya, 2019). Крім того, SWW містить ціанід водню, який утворюється під час таких процесів подрібнення, як очищення, нарізання, віджимання та подрібнення бульб маніоки. У високих концентраціях ціанід стає токсичним для живих організмів. Окрім своєї токсичної природи, ціанід добре відомий своєю метаболічною інгібіторною дією. Це також може впливати на позаклітинну секрецію грибів. Зрештою, екстракція ловастатину з внутрішньоклітинної частини грибкових культур ускладнює подальшу обробку через наявність структурних аналогів і проміжних продуктів (Zuhra & Szabo, 2021). На виробництво ловастатину значною мірою впливають повільно метаболізовані джерела вуглецю (лактоза, гліцерин і фруктоза) порівняно з глюкозою. Шлях, що веде до синтезу ловастатину з використанням вуглецю, є повільнішим, ніж той, який використовує вуглець для виробництва біомаси (глюкози), оскільки ловастатин є продуктом вторинного метаболізму. Таким чином, крохмаль, джерело вуглецю, що повільно метаболізується, присутній у SWW та SM, може впливати на виробництво біомаси та ловастатину.

Хоча вміст ловастатину був нижчим у SWW, ніж у SM, його було обрано для кінетичного аналізу через його низьку вартість, високу доступність, економічні фактори та вплив на навколишнє середовище.

Результати показали, що вихід ловастатину буде підвищений, якщо в середовищі будуть присутні необхідні поживні речовини. Такі висновки узгоджуються з Hajjaj та ін. (Hajjaj, Niederberger & Duboc, 2001) і помітили, що відносно низькі рівні ловастатину виробляються (0,034 мг/г $^{-1}$ год $^{-1}$) у культурах, які ростуть з високою питомою швидкістю росту (0,070 год $^{-1}$), тоді як більш висока продуктивність (0,093 мг/г $^{-1}$ год $^{-1}$) було досягнуто при менших швидкостях росту (0,052 год $^{-1}$). Голодування через брак основних поживних речовин (відсутність залишкового вмісту крохмалю в SWW) у цьому дослідженні, як виявилося, блокувало ріст грибів і вироблення ловастатину.

A. terreus KPR12 виробляв оптимальний титр 450,79 мг/л ловастатину в SWW без додаткового живлення або методів покращення штаму. Ці знахідки прокладають шлях до рентабельного та ефективного виробництва ловастатину шляхом мікробної ферментації, під час якої розчинний крохмаль у SWW ефективно перетворюється на цінні побічні продукти. Таке інтегроване застосування *A. terreus* KPR12 разом із використанням потоків промислових відходів може дати нові переваги для розробки статинів, а також ефективного управління відходами (Srinivasan, Thangavelu & Uthandi, 2022).

2.4.1. Впровадження зеленої хімії для синтезу ловастатину

Після успішного впровадження екологічної хімії для синтезу симвастатину аналогічні зусилля були спрямовані на синтез ловастатину. Як згадувалося, ловастатин є природним метаболітом *A. terreus*, що утворюється під час його ферментації. Для цього потрібно 11 молекул малоніл-коферменту А, одна молекула S-аденозил-S-метіоніну та 5 ферментів, з яких ацилтрансфераза LovD є найважливішим ферментом, який бере участь в останньому етапі біосинтезу. Рекомбінантна форма цього ферменту наразі використовується для швидшого, чистішого та ефективного зеленого синтезу ловастатину, де метилбутирил-S-метил (або етил) меркаптопропіонат (MB-S-MMP) використовується як ацильний субстрат. Зараз цей метод замінив

використання in vivo ендогенного ферменту в культуральній системі, а також довгий багатоетапний і дорогий хімічний шлях. Крім того, іммобілізація цього рекомбінантного ферменту на твердій матриці та зелений синтез будівельного блоку дозволили швидше та ефективніше виробляти ловастатин з мінімальним використанням буфера та реагентів. Цей метод не тільки заощадив кошти, але й заощадив навколишнє середовище, збільшивши переробку (Money, 2016).

2.5. Мевастатин

Мевастатин був вперше виділений як протигрибковий метаболіт із ферментаційного бульйону *Penicillium brevicompactum* у 1976 році. Тоді мевастатин комерційно вироблявся з використанням *Penicillium citrinum* (Endo та ін., 1977; Endo та ін., 1986), а Biocon повідомляв про його виробництво шляхом твердофазної ферментації (SSF) за допомогою великомасштабного біореактора з твердою матрицею (Suryanarayan та ін. ., 2001); однак доступної інформації про процедуру, яку застосовував Biocon, не так багато.

Для виробництва мевастатину перевіряли різні джерела вуглецю та азоту. Спочатку були протестовані різні джерела вуглецю для відповідного росту *A. terreus* і максимального виробництва мевастатину.

Мевастатин є вторинним метаболітом і необхідний максимальний ріст організму, який, у свою чергу, залежить від типу джерела вуглецю. Різними джерелами вуглецю, які використовуються в наших експериментах, є глюкоза, фруктоза, галактоза, маноза, сахароза, лактоза, мальтоза та ксилоза. Серед вищезгаданих джерел вуглецю лише деякі впливали на ріст організму та на виробництво мевастатину, джерела азоту не додавались. Глюкоза виробляла максимальну кількість мевастатину 86,6 мг/л. Друге найбільше виробництво було отримано з лактози 68,74 мг L-1 мевастатину. Глюкозу вибрано як єдине джерело вуглецю для подальших експериментів з оптимізації. Висока продуктивність можлива лише за наявності достатньої кількості джерела вуглецю та додаткових прекурсорів у середовищі.

Джерела азоту впливають на виробництво мевастатину; тому було проведено скринінг різних джерел азоту, підтримуючи постійні глюкозу та інші компоненти середовища. Різні джерела азоту, використані в цьому дослідженні (Mahin Basha Syed & Rajasimman, 2015): пептон, соєвий шрот, дріжджовий екстракт, сечовина, хлорид амонію, сульфат амонію та солодовий екстракт. Серед перерахованих вище джерел азоту соєвий шрот мав великий вплив на виробництво мевастатину. При додаванні джерела азоту відбувається різке збільшення вироблення мевастатину. Комбінація соєвого шроту та глюкози виробляла максимальну концентрацію мевастатину 110,78 мг/л.

Вплив різних складових середовища вивчали за допомогою RSM. Оптимізацію компонентів середовища з використанням *A. terreus* проводили, зберігаючи концентрацію інших поживних речовин на постійному рівні. Ці компоненти середовища здебільшого впливають на ріст грибів і виробництво вторинних метаболітів.

RSM — це послідовна процедура з початковою метою швидко й ефективно вести експериментатора шляхом удосконалення до загальної близькості до оптимуму. Методологію поверхні відповіді (RSM) використовували для оптимізації ферментаційного середовища для посилення виробництва мевастатину (Mahin Basha Syed & Rajasimman, 2015).

2.6. Правастатин

До розробки правастатину компанія Sankyo проводила клінічні випробування компактину, першого інгібітора синтезу холестерину. Пошуки інгібіторів синтезу холестерину Sankyo почали в 1971 році, а в 1973 році був відкритий інгібітор ГМГ-КоА-редуктази ML 236B (компактин). Завдяки доклінічним дослідженням компактину дослідницька група продемонструвала, що: існують чіткі видові відмінності в гіпохолестеринемічному ефекті компактину, і тестування ефективності препарату in vitro та in vivo з використанням тваринної моделі щурів не є послідовним для цього причина.

У 1979 році правастатин, який є більш потужним і демонструє кращу специфічність до органів-мішеней, ніж компактин, був відкритий під час процесу дослідження метаболізму ліків для розробки компактину.

Правастатин має такі дві характеристики, які відрізняють його від ловастатину та симвастатину Merck, які також були відкриті та розроблені протягом 1980-х та на початку 1990-х років: висока розчинність у воді та тканинна специфічність для печінкової системи. З трьох перших статинів правастатин має найнижчий коефіцієнт розподілу октанол-вода.

Правастатин є водорозчинним грибковим похідним, який має важливий вплив на зниження рівня загального холестерину та холестерину ЛПНЩ. Інгібування ГМГ-КоА-редуктази збільшує поглинання холестерину ЛПНЩ печінкою завдяки збільшенню обміну рецепторів ЛПНЩ і, як наслідок, зниження рівня холестерину ЛПНЩ у плазмі (Bizukojc & Ledakowicz, 2015; Syed & Rajasimman, 2015). Гідрофільність правастатину вважається значним внеском у його глобальний успіх.

Цей препарат є останнім статиновим похідним гриба, відкритим у 1991 році. Однак відомо, що правастатин є статином з більшою селективністю порівняно з усіма іншими статинами, оскільки він вважається менш шкідливим з-поміж своїх аналогів. Загальна ефективність правастатину та ловастатину вказує на те, що, як також показали дослідження, майже однакові дози, що застосовуються з обома препаратами, досягають однакового процентного ефекту зниження холестерину (Weng, Yang, Lin & Tai, 2010).

На відміну від симвастатину, де перетворення ловастатину на симвастатин є хімічною реакцією, реакція синтезу правастатину є біотрансформацією.

Процес виробництва правастатину на даний момент є його основною проблемою, оскільки його основний синтез залежить від біотрансформації компактину (мевастатину) штамами *Penicillium* промислово. Цікаво, що саме

виробництво правастатину є причиною такого обмеження. Оскільки правастатин сильно залежить від швидкості вироблення компактину в клітинах, підвищення концентрації компактину викликає процес аутолізу в клітинах. Швидкість вироблення правастатину зростала набагато повільніше, ніж у більшості статинів (Barrios-González & Miranda, 2010). В даний час вивчаються нові штами та їх потенціал витримувати більш високі концентрації мевастатину або нові метаболічні процеси виробництва правастатину (McLean та ін., 2015; Seydametova, 2013; Seydametova, 2015).

Іншим способом виробництва є біотрансформація компактину в правастатин. Правастатин отримують після стереоселективного гідроксилювання компактину в положенні С-6. У промисловості це досягається двоетапним процесом виробництва. По-перше, ферментація *P. citrinum* виробляє компактин. Далі статини очищають і лактонне кільце відкривають шляхом додавання гідроксиду натрію. Після нейтралізації відкривається лактонна форма компактину перетворюється на правастатин на етапі біотрансформації за допомогою бактерії *Streptomyces carbophilus*. Цей організм містить фермент цитохрому Р450 (Р450 або CYP), який здатний гідроксилювати компактин стереоспецифічно в С-6 із загальним виходом 70% (P450sca-2). CYP є гемопротеїнами, що представляють біотехнологічний інтерес завдяки їхній здатності здійснювати регіо- та стереоселективне хімічне введення кисню. Вони найбільш відомі своєю ключовою роллю в синтезі людських стероїдів і в детоксикації та метаболізмі ліків/ксенобіотиків (McLean та ін., 2015).

Правастатин, отриманий з компактину шляхом хімічного синтезу, продемонстрував такі обмеження, як висока вартість і наявність стереоізомерів. Біотрансформація компактину в правастатин здається економічно ефективною. Дослідження ефективності біотрансформації компактину свідчать про використання високих концентрацій компактину. Тим не менш, його висока протигрибкова активність пригнічує ріст клітин і призводить до їх автолізу. Для

цього були розроблені штами з геном резистентності для досягнення високої продуктивності (Syed & Ponnusamy, 2017).

Процес бродіння необхідний для отримання компактину та перетворення його на правастатин у тому самому процесі бродіння. У цьому випадку, як правило, рекомбінантний мікроорганізм використовується для одночасного здійснення як продукції компактину, так і біотрансформації (Neto та ін., 2019).

Недавні дослідження показали, що виробництво правастатину за одну стадію ферментації можливе. Ферменти, відповідальні за гідроксилювання, генетично закладені в гриб *Penicillium chrysogenum*, що продукує пеніцилін. Це призводить до ефективного виробництва правастатину в промислових масштабах (McLean та ін., 2015).

2.6.1.Стратегія додавання джерел вуглецю

Для проведення процесу бродіння використовуються періодичний та безперервний режими. У режимі періодичної підживлення джерело вуглецю подається з перервами разом із компактином. У безперервному культивуванні для біотрансформації до культурального бульйону можна додати джерело вуглецю, що більше засвоюється (тобто глюкозу). У цьому випадку декстроза подається разом із компактином періодично під час біоконверсії.

2.6.2. Періодичне додавання компактину

Компактин є субстратом (лімітуючим субстратом) у процесі бродіння. Збільшення додавання компактину або його накопичення пригнічують ріст мікроорганізмів, тому кількість субстрату, що подається у ферментаційний бульйон, має бути оптимізована. Періодичне додавання субстрату здається хорошою стратегією для досягнення вищих показників біоконверсії (Lin, Tang & Lin, 2011).

2.7. Генетичні маніпуляції для підвищення продукції статинів

Техніка генетичних маніпуляцій була застосована для покращення виробництва статинів. Вони варіюються від традиційних методів мутагенезу до

сучасних методологій, таких як використання іРНК і генної інженерії. Вони забезпечують більш ефективні штами, які здатні діяти швидше або з кращою якістю, ніж їхні відповідні штами дикого типу.

Генетичні маніпуляції були проведені з метою отримання штамів з високою ефективністю для виробництва статинів, зокрема ловастатину та симвастатину (Talan та ін., 2011; Ames та ін., 2012). Ці дослідження включали індукцію випадкових мутацій фізичними агентами, генетичне мовчання за допомогою дволанцюгової РНК-опосередкованої інтерференції (RNAi) та маніпуляції безпосередньо з генами, залученими до виробництва статинів (гени Lov). шляхом включення в штами *Escherichia coli*.

Крім того, використання *E. coli* у виробництві статинів виявилося дуже важливим, оскільки крім найшвидшого росту (як описано вище), цю бактерію можна використовувати для виробництва рекомбінантних генів, які показали перспективним у виробництві як ловастатину, так і симвастатину. Використання DMB-S-MMP є надзвичайно важливим для покращення вироблення статинів, діючи як ефективний донор донора ацилу, що дозволяє пряме перетворення монаколіну J у симвастатин (у присутності LovD).

Ця еволюція у виробництві статинів створює чудову перспективу щодо виробництва нових ліків, а також використання нових методів, головним чином у сфері молекулярних досліджень для виробництва нових і кращих ліків, можливо, з нижчою вартістю та коротшим виробництвом. час. Здавалося б, багатообіцяючою мішенню для подальших досліджень є білки з сімейства Lov, які беруть активну участь як у виробництві ловастатину, так і в його перетворенні в монаколін J, а пізніше в симвастатин. Проте необхідні додаткові дослідження, щоб оцінити, чи є нова еволюція у способі виробництва статинів (Dikshit & Tallapragada, 2016).

2.7.1. Генетичні маніпуляції в нитчастих грибах для виробництва статинів

Нецілеспрямовані маніпуляції з геномом грибів для виробництва ловастатину проводили за допомогою опромінення важкими іонами бобів та ультрафіолетового світла (Talan та ін., 2011; Mukhtar, Ijaz & Ikram-ul-Haq., 2014). За допомогою цих стратегій було отримано штами з більшою здатністю виробляти статини, хоча вони не повідомляли про генетичні зміни, пов'язані з цими діями. У першому прикладі *A. terreus* (CA99) піддавали опроміненню важкими іонами бобів і вимірювали виробництво ловастатину. Виробництво ловастатину було вищим у групах, які зазнали опромінення (*A. terreus Z15-7*), ніж у тих групах, у яких опромінення не було (*A. terreus CA99*) (Talan та ін., 2011). В іншому дослідженні мутанти були отримані шляхом впливу на *A. terreus* NRRL ультрафіолетового світла та сильних кислот. Пізніше було оцінено виробництво ловастатину в усіх цих групах. Група, яка піддавалася ультрафіолетовому випромінюванню, показала вищу продукцію ловастатину, ніж інші групи (Mukhtar, Ijaz & Ikram-ul-Haq., 2014).

В інших дослідженнях автори провели відбір штамів *A. terreus* з високою здатністю продукувати ловастатин. Кращий штам (*A. terreus* GD13, який продукував 190 мг.л-1 ловастатину) був підданий мутаційному відбору на основі стійкості до ловастатину та інгібіторів синтази жирних кислот. Після трьох циклів мутагенезу мутанти (*A. terreus* EM19) показали продуктивність 1424 мг.л-1 (приблизно в 7,5 разів більше, ніж штам дикого типу). *A. terreus* також був модифікований для виробництва монаколіну J шляхом введення гена, що кодує гідролазу ловастатину з *P. chrysogenum*. Цей фермент є високоспецифічним для перетворення ловастатину в монаколін J. Сконструйований штам *A. terreus* продемонстрував високу ефективність гідролізу біосинтезованого ловастатину до монаколіну J за допомогою одноетапного процесу (Huang, Liang, Yang & Lu, 2017).

Нещодавно було запропоновано використовувати систему CRISPR/Cas для покращення продукції ловастатину (El-Sayed, Abdel-Ghany & Ali, 2017).

Система CRISPR/Cas — це вдосконалений інструмент для маніпулювання геномом, який використовувався для кількох організмів, у тому числі нитчастих грибів, збільшуючи виробництво ключових метаболітів і, таким чином, знижуючи витрати та покращуючи виробництво (Katayama та ін., 2016). Враховуючи, що це відносно нова сфера, яка чекає на дослідження, розуміння того, як гени Lov працюють навколо себе, може виявитися корисним для майбутніх перспектив виробництва ловастатину (El-Sayed, Abdel-Ghany & Ali, 2017).

Як зазначено вище, виробництво правастатину здійснюється за допомогою двоетапної процедури (ферментація та біотрансформація), що робить процес дуже дорогим. У цьому сенсі штам-продуцент антибіотиків *Penicillium chrysogenum* DS50662 був перепрограмований шляхом введення шляху компактину та оптимізації каталітичної дії ферменту, який бере участь у гідроксилюванні компактину (цитохром P450 з *Amycolatopsis orientalis*). Такий підхід призвів до єдиного процесу з високим рівнем продукції правастатину (McLean та ін., 2015).

Іншим процесом, який був включений у виробництво антиліпеміків, було використання інтерференції, опосередкованої дволанцюговою РНК (RNAi). У цьому випадку RNAi було розроблено з наміром заглушити ген lovF, щоб індукувати інший (і коротший) метаболічний шлях для перетворення монаколіну J у симвастатин. Для цього була сконструйована модифікована плазміда, що містить ділянки, які кодують RNAi, відповідальні за глушіння LovF, і вставлена в *A. terreus*.

Цей процес трансформації був опосередкований бактерією *Agrobacterium tumefaciens*. Було оцінено, що перетворення монаколіну J у симвастатин було ефективним, зменшуючи процес перетворення лише за одну стадію ферментації. Однак ці результати отримані лише в присутності DMB-SMMP

(диметилбутирил-S-метилмеркаптопропіонат) (Li, N., Li, M., Yu, Zhou & Huang, 2016).

2.8. Біоконверсія статинів

Дослідження біоконверсії *Streptomyces sp*. Y-110, виділений із ґрунту, продемонстрував, що найвище виробництво правастатину становило 340 мг/л із 750 мг компактину/л за 24 години. Періодичне введення компактину в культуральне середовище призвело до збільшення конверсії компактину до 1000 мг правастатину/л зі швидкістю конверсії 10 мг правастатину/л/год, тоді як безперервне введення компактину призвело до подальшого збільшення до 15 мг правастатину/л. л/год. Подібним чином дослідження біоконверсії *Pseudonocardia carboxydivorans* PAH4 для перетворення компактину на правастатин показали, що попередня інкубація в середовищі, що містить 0,005 % компактину натрію, призвело до майже 100 % використання компактину в середовищі, що містить компактин 1 мг/мл. Швидкість перетворення правастатину становила до 68 % після 6 днів інкубації. Штам *Pseudonocardia autotrophica*, трансформований pTAOR4-P450, що несе ген монооксигенази цитохрому P450, виявив збільшення продукції правастатину в 3,3 рази (Lin, Chung-Liang, Tang, Ya-Li Lin & Shyh-Mirn, 2011).

Дослідження біоконверсії вуксістатину з ловастатину *Amycolatopsis sp.* (CGMCC 1149) припустив утворення проміжного продукту I, що складається з додаткової гідроксильної групи в метильній групі, приєднаній до C3, порівняно з ловастатином. Реакція гідроксилювання, що встановлюється в безклітинній системі, інгібується CO та посилюється АТФ, Fe^{2+} та аскорбіновою кислотою. Це свідчить про те, що гідроксилаза, відповідальна за перетворення, була індукованим цитохромом P450. Протеомні дослідження припустили індукцію трьох білків, ідентифікованих як інтегральний мембранний білок, Fe–S-оксидоредуктази та GTP-зв'язуючого білка YchF, які були необхідні під час реакції гідроксилювання (Zong та ін., 2013).

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ)

Статини є препаратом вибору для лікування гіперхолестеринемії через їх доведену ефективність і профіль безпеки, і вони можуть проявляти антиатеросклеротичну дію незалежно від їх гіполіпідемічної дії (Goswami, Vidyarthi, Bhunia & Mandal, 2012). Ці препарати мають багато спільних рис, але також демонструють відмінності у фармакологічних властивостях, які можуть сприяти відмінностям у клінічній користі та ефективності в модифікації ліпідних факторів ризику ішемічної хвороби серця. Деякі з властивостей, бажаних при терапії статинами, включають потужне оборотне інгібування редуктази гідроксиметилглутарилкоензиму А (ГМГ-КоА), здатність значно знижувати рівень холестерину ліпопротеїдів низької щільності і холестерину ліпопротеїдів невисокої щільності, здатність підвищувати рівень холестерину ЛПВЩ, вибірковість тканин (яка зосереджується на ефекті лікування), оптимальна фармакокінетика, яка обмежує системну біодоступність і пропонує одноразове дозування, а також низький потенціал взаємодії між ліками.

Усі статини перешкоджають перетворенню ГМГ-КоА у попередник холестерину мевалонат за допомогою ГМГ-КоА-редуктази, що є раннім і обмежує швидкість етапом синтезу холестерину. Статини конкурентно пригнічують ГМГ-КоА-редуктазу шляхом зв’язування з ферментом і стеричного інгібування зв’язування субстрату. Ступінь інгібування статинів може відрізнятися залежно від міцності їх зв’язку з ферментом (McKenney, 2003).

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ на основі обраної субстанції, галузей використання, потреби у ЛЗ

3.1.1. Фармакологічні властивості ловастатину

Ловастатин – це засіб, що знижує рівень холестерину, вперше виділений із штаму *Aspergillus terreus* (Hassan та ін., 2019). Він був схвалений FDA для лікування та профілактики ішемічної хвороби серця, гіперхолестеринемії та пацієнтів підліткового віку з гетерозиготною сімейною гіперхолестеринемією.

Ловастатин в основному покращує функцію ендотелію, модулює запальні реакції, підтримує стабільність бляшок і запобігає утворенню тромбів, завдяки чому всі різного роду захворювання, пов'язані з артеріями, можна вилікувати, і було припущено, що це наслідок зменшення ліпідного ядра атеросклеротичної бляшки, що дозволяє уникнути розриву бляшки, який інакше спровокував би інтрамуральний крововилив і внутрішньопросвітний тромбоз (Goswami, Vidyarthi, Bhunia & Mandal, 2012).

Ловастатин метаболізується в свою активну форму бета-гідроксикислоти в шлунку та функціонує для конкурентного інгібування 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А (ГМГ-КоА) редуктази. Цей фермент бере участь у обмежувальній стадії синтезу холестерину. Інгібітори ГМГ-КоА також знижують рівень високочутливого С-реактивного білка, покращують функцію ендотелію, зменшують запалення в місцях коронарних бляшок, пригнічують агрегацію тромбоцитів і мають антикоагулянтну дію (Ray & Cannon, 2005). Крім того, зниження рівня холестерину в сироватці стимулює експресію рецепторів ЛПНЩ на гепатоцитах, що ще більше посилює катаболізм ЛПНЩ.

Мевалонат є необхідним будівельним матеріалом для біосинтезу холестерину, а ловастатин перешкоджає його виробленню, діючи як оборотний конкурентний інгібітор ГМГ-КоА, який зв'язується з ГМГ-КоА-редуктазою. Інгібування відбувається через структурну гомологію між β-гідроксикислотною формою статинів і утвореним проміжним продуктом ГМГ-КоА (рис. 5).

Ловастатин і споріднені сполуки, за винятком правастатину, виробляються як преліки, будучи сумішшю лактону та β-гідроксикислоти. Лактонне кільце перетворюється у відповідну форму β-гідроксикислоти in vivo. Ловастатин, будучи неактивним у нативній формі, формі, у якій його вводять, гідролізується в організмі до форми β-гідроксикислоти, і саме ця форма є активною (Goswami, Vidyarthi, Bhunia & Mandal, 2012).

Ловастатин має 30% біодоступності із великим ефектом першого проходження; менше 5% потрапляє в системний кровотік. При прийомі незалежно від їжі його біодоступність знижується на 50%. Його період напіврозпаду становить від 1,1 до 1,7 години, а зв'язування з білками перевищує 95%. Він метаболізується до бета-гідроксикислоти (активної форми) за допомогою CYP3A4, з виведенням 80-85 % з калом і 10 % із сечею. Терапевтична відповідь спостерігається через 2 тижні, а максимальна відповідь — через 4-6 тижнів (Schachter, 2005).

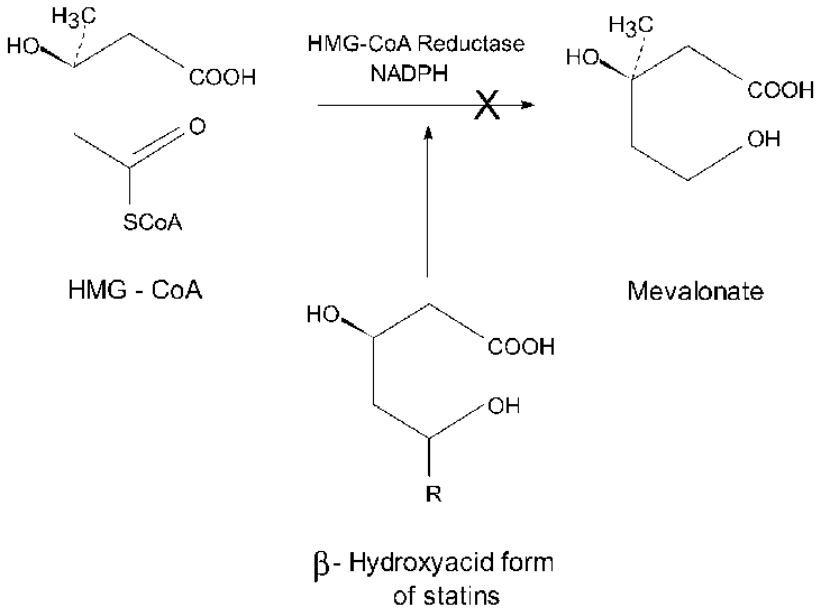


Рис. 5. Структурна аналогія між HMG-CoA та β-гідроксикислотною формою статинів та механізм інгібування

3.1.2. Галузі використання ловастатину

Ішемічна хвороба серця (ІХС)

Статини є препаратом вибору для лікування гіперхолестеринемії через їх доведену ефективність і профіль безпеки, і вони можуть надавати антиатеросклеротичну дію незалежно їх гіполіпідемічної дії. Оскільки метаболізм ловастатину генерував низку ізопреноїдів, життєво важливих для різних клітинних функцій, від синтезу холестерину до контролю клітинного росту та диференціювання, інгібування ГМГ-КоА-редуктази має корисні плейотропні ефекти (Gibbons та ін., 2003).

Отже, ловастатин значно знижує частоту коронарних станів, як у первинній, так і вторинній профілактиці, будучи найефективнішими гіполіпідемічними сполуками, які знижують рівень смертності у хворих на коронарні захворювання. Ловастатин також відіграє все більшу роль у управлінні ризиком серцево-судинних захворювань у пацієнтів із відносно нормальним рівнем холестерину в плазмі. Широкомасштабні клінічні випробування продемонстрували, що статини суттєво знижують захворюваність і смертність, пов’язану з серцево-судинними захворюваннями, у пацієнтів з ІХС та без неї. Обсерваційні дослідження продемонстрували підвищений ризик ішемічного інсульту при високому рівні холестерину та підвищений ризик геморагічного інсульту при низькому рівні холестерину. Припускають, що низький рівень холестерину може спричиняти геморагічний інсульт, сприяючи ослабленню ендотелію малих церебральних артерій.

Ловастатин в основному покращує функцію ендотелію, модулює запальні реакції, підтримує стабільність бляшок і запобігає утворенню тромбів, за допомогою якого можна вилікувати всі види захворювань, пов’язаних з артеріями, і було припущено, що наслідком скорочення ліпідного ядра атеросклеротичної бляшки є уникнення розрив бляшки, який інакше спровокував би інтрамуральний крововилив і внутрішньопросвітний тромбоз (Seenivasan, Subhagar, Rajendran & Thangavelu, 2008).

Ліки від хвороби Альцгеймера (ХА)

Було виявлено, що лікування ловастатином знижує поширеність ХА у пацієнтів, які страждають на гіперхолестеринемію. Багато з відомих факторів ризику ХА були пов'язані з метаболізмом холестерину. Цікаво, що більш високі дози ловастатину, тобто інгібіторів біосинтезу холестерину шляхом блокування утворення мевалонату, можуть уповільнити прогресування ХА. Однак механізми, за допомогою яких ловастатин або рівень холестерину впливають, невідомі. Альтернативна обробка білка-попередника амілоїду (APP) у мозку пацієнтів з ХА призводить до вироблення нейротоксичного бета-амілоїдного білка, причинного фактора патології ХА. Ці висновки привели до проспективних клінічних випробувань статинів, що знижують рівень холестерину, у пацієнтів з ХА, навіть якщо багато досліджень не підтверджують підвищення рівня холестерину в сироватці крові та мозку як фактор ризику розвитку хвороби Альцгеймера. Таким чином, на сьогоднішній день недостатньо доказів, щоб припустити використання ловастатину для лікування пацієнтів з ХА. Декілька досліджень продемонстрували, що розщеплення білка-попередника амілоїду можна модулювати шляхом зміни рівня холестерину в мембранах in vitro (Radha & Lakshmanan, 2013).

Ловастатин при лікуванні захворювань нирок

Важливі досягнення були в лікуванні пацієнтів з прогресуючим захворюванням нирок. Інгібітори ГМГ-КоА-редуктази можуть забезпечувати захист від захворювань нирок, що характеризуються запаленням та/або посиленою проліферацією епітеліальних клітин, що виникає при швидко прогресуючому гломерулонефриті або посилені проліферації мезангіальних клітин, що виникає при IgA-нефропатії.

Механізми, що лежать в основі дії статинів, ще недостатньо вивчені, хоча останні дані в літературі показують, що вони можуть безпосередньо впливати на баланс проліферації, зниження регуляції запальних хемокінів. Ловастатин

може безпосередньо впливати на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що беруть участь у пренілуванні білків з низькою молекулярною масою, які відіграють вирішальну роль у передачі клітинного сигналу та активації клітин. Що стосується захворювань нирок, було показано, що терапія ловастатином запобігає зниженню кліренсу креатиніну та сповільнює втрату функції нирок, особливо у випадку протеїнурії, і її сприятливий ефект може залежати лише частково від ослаблення гіперліпідемії (Buemi та ін., 2002).

Антиракова дія

Ловастатин також має протиракову дію. Тому біологічна активність ловастатину, особливо його протираковий ефект, привернула увагу дослідників. Кілька in vitro досліджень підтвердили, що ловастатин має значний пригнічуючий ефект на життєздатність ракових клітин при різних видах раку (таких як рак молочної залози, печінки, шийки матки, легенів і товстої кишки) (Murakami та ін., 2016; Siegel, 2013; Hu, Lin, Gao, Lin & Duan, 2022; Liu та ін., 2022; Xiao ті ін, 2022). У той же час ловастатин також може підвищувати чутливість деяких видів ракових клітин до хіміотерапевтичних препаратів і посилювати їх терапевтичний ефект. Ловастатин пригнічує проліферацію клітин і регулює сигнальні шляхи ракових клітин, тим самим індукуючи апоптоз і зупинку клітинного циклу (Liguo та ін., 2021).

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

4.1 Потреба у цільовому продукті

Серцево-судинні захворювання (ССЗ), як і раніше, посідають перше місце в структурі смертності громадян України, близько 650 на 100 тис. населення (Коваленко, 2016), причому в більшості випадків в основі їх патогенезу лежить атеросклеротичне ураження кровоносних судин. Експериментальні, епідеміологічні і клінічні дослідження, проведені за останні 50 років, виявили тісний зв'язок між порушенням ліпідного спектра (дисліпідеміями) та розвитком атеросклерозу. За даними Національного наукового центру «Інститут кардіології ім. М.Д. Стражеска» АМН України в українській популяції підвищення рівня загального холестерину серед населення працездатного віку спостерігається в середньому в 40–50% випадків.

У той же час виявлений прямий кореляційний зв'язок між захворюваністю та смертністю від ІХС, з одного боку, і рівнем холестерину в крові — з іншого, а гіперхолестеринемія в поєднанні з палінням, ожирінням, АГ, цукровим діабетом і віком є основним предиктором розвитку атеросклерозу та його ускладнень. Підтвердження прогностичного значення гіперхолестеринемії отримано в результаті багатоцентрових досліджень, насамперед таких як MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial) і Seven Countries Study, згідно з якими у великих популяціях продемонстрований ріст абсолютних і відносних характеристик смертності від ІХС у прямій залежності від рівня загального холестерину (Мітченко & Лутай, 2007).

За останні роки загальний рівень споживання статинів виріс майже в 2 рази, але при порівнянні обсягів споживання та рівня захворюваності у нашій країні на серцево-судинні захворювання слід зазначити, що тільки частка хворих, яким показаний прийом даної групи препаратів, щоденно споживає необхідну дозу (Malay, 2014).

Пацієнти з гіпертензією, а тим більше пацієнти з цукровим діабетом 2-го типу або метаболічним синдромом, часто мають атерогенну дисліпідемію, що характеризується підвищеними рівнями тригліцеридів і холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ХС ЛПНЩ) і низьким рівнем холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ХС ЛПВЩ). Це обґрунтовує застосування статинів у пацієнтів з гіпертонічною хворобою, які мають середньо-високий серцево-судинний ризик (Бабак та ін., 2019).

Статини – обов'язковий компонент комплексного лікування ССЗ атеросклеротичного генезу, які не лише зменшують рівень атерогенних фракцій ліпідів, а й підвищують ХС ЛПВЩ та мають низку плейотропних ефектів, що сприяють стабілізації атероми та зменшують ризик атеротромботичних ускладнень (Ханюков, 2020).

4.2. Розрахунок річної потужності виробництва ловастатину

Станом на сьогодні в Україні, налічується 10,4 млн хворих на артеріальну гіпертензію (АГ), 7,7 млн хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС) та 1 млн пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю (ХСН) (Ханюков, 2020). Всі ці захворювання є прямим показанням для застосування статинів з метою лікування або профілактики гіперглікемії.

Для розрахунку потреби необхідно дізнатися загальну кількість людей, яким показаний прийом статинів. Як відомо пацієнти з ІХС та ХСН, у більшості випадків, в анамнезі мають АГ. Тому далі розрахунки проводитимуться з урахуванням того, що у 90 % людей з ІХС та ХСН є підвищений артеріальний тиск, тобто

10,4*0,9 – 7,7 – 1 = 660 тис. людей, які виключно мають АГ.

Тому, для подальших розрахунків візьмемо: 0,66 + 7,7 + 1 = 9,36 млн людей.

Рекомендована доза статинів на добу становить від 10-40 мг, в середньому візьмемо 20 мг/добу, тобто 1 таблетка.

Беручи до уваги той факт, що профілактичне застосування статинів має проводитися щодня впродовж усього життя, тоді

20 мг * 9,36 млн = 187,2 кг/добу.

Тепер розрахуємо кількість статину на рік: 187,2 * 365 = 68328 кг.

Округлимо до 70000 кг статину на рік.

За даними 2019 року (Євтушенко, Нємцова & Чайковська, 2019) частка ловастатину в загальному обсязі реалізації статинів в Україні становить 0,2 %, тоді

70000 кг * 0,002 = 140 кг/рік ловастатину.

Оскільки вихід ловастатину (концентрація у культуральній рідині) становить 9,7 мг/мл = 9,7 кг/м^3, а потреба 140 кг/рік, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік:

$$V_{КР}^{річ} = 140/9,7 = 14,4 \text{ м}^3$$

З урахуванням 10% втрат під час виробництва річна потужність має становити

$$Gp = 14,4+14,4\times0,1 = 15,8 \text{ м}^3.$$

4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і об'єму ферментера

Приймаємо кількість робочих днів на рік – 365. Ефективний фонд робочого часу

Nеф. = 365×24 = 8760 год.

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

Тцф = Тф+Тдр = 224 +10 = 234 (год), де

Тф – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

Тдр – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість циклів за рік становитиме:

$$nц = \frac{Neф}{Tцф} = \frac{8760}{234} = 37{,}4$$

Об’єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{КР}^{ц} = V_{КР}^{річ} / nц = 15{,}8/37{,}4 = 0{,}42 \text{ л}$$

Обираємо ферментер об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення Кз = 0,5. Об'єм культуральної рідини становить Vк.р = 0,5 м^3, відповідає розрахованому, тобто обраний вірно.

Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріала. Виходячи із геометричного об’єму виробничого ферментеру та обраного коефіцієнту його заповнення, розраховуємо його робочий об’єм з врахуванням втрат при біосинтезі Еф = 0,11.

Vроб.1=Vкр / (1-Еф) = 420/(1- 0,11) = 471 л.

При вибраному коефіцієнті заповнення Кз = 0,5 визначаємо приблизний геометричний об’єм ферментера

Vпф = Vроб.1/Кз = 471/0,5 = 942 л

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера задаємо Хф = 10 % від об’єму поживного середовища. Кількість поживного середовища становить

Vпсф = Vроб.1/(1+ Хф) = 471/1,1= 428 л

Тоді кількість посівного матеріалу складе

Vпмф = Vроб.1 - Vпсф = 471 – 428 = 43 л

Таку кількість посівного матеріалу, можна одержати під час культивування продуцента в інокуляторі з робочим об'ємом

Vроб.2 = Vпмф/(1-Еін) = 43/0,95 = 45 л, де Еін – втрати посівного матеріалу при його вирощуванні в інокуляторі. При вибраному коефіцієнті заповнення Кз = 0,5 визначаємо приблизний геометричний об'єм ферментера

Vпф = Vроб.1/Кз = 45/0,5 = 90 л

Кількість посівного матеріалу (доза) для інокулятора а задаємо Хін = 10 % від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища становить

Vпсін = Vроб.2/(1+ Хін) = 45/1,1= 41 л

Тоді кількість посівного матеріалу складе

Vпмін = Vроб.2 - Vпсін = 45 – 41 = 4 л

Таку кількість посівного матеріалу, можна одержати під час культивування продуцента в колбах з робочим об'ємом Vкол = 0,75 л та коефіцієнтом заповнення Ккол = 0,2.

Vроб.3 = Vпмін(1-Екол) = 4/0,99 = 4040 мл, де Еінкол = 0,01- втрати посівного матеріалу при його вирощуванні в колбах.

Кількість в качалочних колб складе

Nколб = Vроб.3 / Vкол ·Ккол = 4040/750·0,2 = 26,9. Приймаємо 27 колб. Кількість посівного матеріалу (доза) для колб задаємо Хкол = 10 % від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища становить

Vпскол = Vроб.3 / (1+ Хкол) = 4040/1,1= 3672 мл

Тоді кількість посівного матеріалу складе

Vпмкол = Vроб.3 - Vпскол = 4040 – 3672 = 368 мл

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ловастатину у ферментері об'ємом 1 $м^3$ з коефіцієнтом загоповнення 0,5 буде проходити у 3 етапи.

4.4. Матбаланс на серію ЛЗ

Матеріальний розрахунок ловастатину - це 140000 таблеток по 1 г, тобто річна потужність складає 140 кг. Кількість серій за рік розраховуємо виходячи з максимального завантаження змішувача (200 кг). Враховуючи втрати сировини на стадіях зважування – 0,3%, просіювання – 0,5%, змішування – 0,5%, таблетування – 2%, фасовка – 2 %, розраховуємо необхідну кількість серій на рік для забезпечення виробництва 70000 контейнерів – 140000/(200-(200×5,3/100)) = 7 серії/рік. Об'єм однієї серії складає: 200/7 = 28571 таблетка/серію.

Таблиця 4.1

Матеріальний розрахунок ловастатину

Надійшло		**Використано**	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	**Кількість,кг**	**Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів**	**Кількість,кг**
1	**2**	**3**	**4**
Зважування сировини, кг			
Ловастатин	70,7	Ловастатин	70,6
Мікрокристалічна целюлоза	45,4	Мікрокристалічна целюлоза	45,3
Лактози моногідрат	12,6	Лактози моногідрат	12,2
Крохмаль модифікований	7,7	Крохмаль модифікований	7,4
Стеарат магнія	3,8	Стеарат магнія	3,3
Індигокармін	1,3	Індигокармін	1,2
Всього:	***140,5***	**Втрати (0,3%)**	**0,42**
		Всього:	***140,5***
Просіювання, кг			
Ловастатин	70,6	Ловастатин	70,4

Закінчення таблиці 4.1

Крохмаль модифікований	7,4	Крохмаль модифікований	7,3
Стеарат магнія	3,3	Стеарат магнія	3,2
Всього:	***81,3***	**Втрати (0,5%)**	**0,4**
		Всього:	***81,3***
Змішування компонентів			
Ловастатин	70,4	Маса для таблетування	***138,9***
Мікрокристалічна целюлоза	45,3		
Лактози моногідрат	12,2		
Крохмаль модифікований	7,3		
Стеарат магнія	3,2		
Індигокармін	1,2		
Всього:	***139,6***	**Втрати (0,5%)**	**0,7**
		Всього:	***139,6***
Стадія таблетування			
Маса для таблетування	138,9	Таблетки	136
Всього:	***138,9***	**Втрати (2,0%)**	**2,9**
		Всього:	***138,9***
Фасовка таблеток			
Таблетки	136	Таблетки	135,5
Всього:	136	Втрати: Всього:	0,5 136
Матеріали: Контейнери	7000 уп.	Матеріали: Контейнери	6860
Всього:	***7000 уп.***	**Втрати (2,0%):**	**140**
		Всього:	***7000***

Сумарні втрати по виробництву препарату ловастатин становлять 5,3%

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

5.1. Обгрунтування вибору біологічного агента

Статини, клас грибкових вторинних метаболітів, стали центром великої уваги через їх здатність впливати на синтез ендогенного холестерину de novo, який становить майже 2/3 загального холестерину в організмі людини (Manzoni, Bergomi, Rollini & Cavazzoni, 1999).

Ловастатин виробляється як вторинний метаболіт полікетидного шляху різними грибами, включаючи *Penicillium spp*.; *Monascus spp*.; *Trichoderma spp*. і *Aspergillus terreus* (Prabhakar та ін., 2011). Повідомлялося, що ловастатин є ефективним протипухлинним засобом і відіграє життєво важливу роль у регуляції багатьох фізіологічних реакцій. Таким чином, він мав багато клінічних застосувань і має більше переваг порівняно з іншими доступними статинами. Виробництво ловастатину шляхом бродіння було економічнішим, ніж хімічний синтез. Комерційне виробництво ловастатину зазвичай здійснювалося шляхом періодичної ферментації *A. terreus* (Janani, Thandeeswaran & Vidhya, 2011).

Виробництво ловастатину шляхом бродіння залежить від складу середовища, в якому джерела вуглецю та азоту відіграють вирішальну роль, оскільки ці поживні речовини безпосередньо пов’язані з утворенням продукту (Prabhakar та ін., 2011).

Тому для вибору біологічного агента доцільно буде порівняти декількох продуцентів за різними параметрами, а саме за складом поживного середовища, тривалістю та умовами культивування. Характеристику різних грибів роду *Aspergillus* представлено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Порівняльна характеристика біологічних агентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість цільового продукту, мг/г	Особливості процесу біосинтезу	Література
***A. terreus* ATCC 74135** (л)	RS (рисова солома) – 20; мінеральний розчин : KH_2PO_4 - 2,1; $MgSO_4$ - 0,3; $CaCl_2$ - 0,3; $FeSO_4$ - 0,11; $ZnSO_4$ - 0,3.	192	0,26	Ферментацію в твердому стані проводили в колбах Ерленмейєра на 500 мл за таких умов: t = 25°C, pH 6, розмір частинок від 1,4 до 2 мм, початковий вміст вологи 50%.	Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Ho, Y. W., Mohamad, R., Goh, Y. M., & Shokryazdan, P. (2012). Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* Using Agro-Biomass as Substrate in Solid State Fermentation. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 1–11. https://doi.org/10.1155/2012/196264
***A. terreus* 4 (л)**	Пшеничні висівки – 50; глюкоза – 11; гліцерин -16; $MgSO_4$ – 0,75; $(NH_4)_2HSO_4$ – 2,3; KH_2PO_4 – 2; мальтоза – 5.	224	9,7	Після зволоження до 55-65%. субстрату додавали 2,5 мл посівного матеріалу (з концентрацією спор 10^7 - 10^8 $мл^{-1}$). Колби рівномірно струшували та інкубували при t - 28°C протягом 14 діб за pH - 7,5. Наприкінці інкубації субстрат SSF висушували при t - 100-105°C, подрібнювали порцеляновою товкачем і ступкою до дрібного порошку та використовували для	Gulyamova, T.; Ruzieva, D.; Masmetova, S.; Sattarova, R.; Lobanova, K.; Abdulmyanova, L.; Rasulova, G. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2013, *5*, 19–24. https://www.ajol.info/index.php/ijest/article/view/168941

				визначення вмісту ловастатину методом ВЕРХ.	
***A. terreus* 20 (л)**	Вівсяні висівки – 50; глюкоза – 11; гліцерин -16; $MgSO_4$ – 0,75; $(NH_4)_2HSO_4$ – 2,3; KH_2PO_4 – 2; мальтоза – 5.	224	9,56	Після зволоження до 55-65%. субстрату додавали 2,5 мл посівного матеріалу (з концентрацією спор 10^7 - 10^8 $мл^{-1}$). Колби рівномірно струшували та інкубували при t - 28°C протягом 14 діб за pH - 7,5. Наприкінці інкубації субстрат SSF висушували при t - 100-105°C, подрібнювали порцеляновою товкачем і ступкою до дрібного порошку та використовували для визначення вмісту ловастатину методом ВЕРХ.	Gulyamova, T.; Ruzieva, D.; Masmetova, S.; Sattarova, R.; Lobanova, K.; Abdulmyanova, L.; Rasulova, G. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2013, *5*, 19–24. https://www.ajol.info/index.php/ijest/article/view/168941
Aspergillus fumigatus	Пшеничні висівки – 10; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,15; $(NH_4)_2HPO_4$ - 0,25; NaCl - 1.	288	3,353	Десять грамів кожного твердого субстрату відбирали окремо в колби Ерленмейєра на 250 мл і зволожували дистильованою водою для підтримки вмісту вологи 70%. Колби інокулювали 2 мл суспензії спор грибів. У колбі ретельно перемішували, щоб забезпечити рівномірний розподіл інокулята, і колби інкубували при 28 °C за pH 5,0.	Mouafi, F. E., Ibrahim, G. S., & Abo Elsoud, M. M. (2016). Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 14(2), 253–259. doi:10.1016/j.jgeb.2016.10.006

Закінчення таблиці 5.1

Оцінюючи данні наведені в таблиці 3.1, можна відмітити, що *Aspergillus fumigatus* має більший вихід цільового продукту – 3,353 мг/г,. порівнюючи з *A. terreus* ATCC 74135 – 0,26 мг/г. Але порівнюючи *Aspergillus fumigatus* з іншими двома продуцентами, можна відмітити, що кількість статину, який він синтезує – майже у 3 рази менша. Тому доцільним буде порівняти між собою *A. terreus* 20 та *A. terreus* 4.

Ці два продуценти мають однаковий час культивування – 224 год, але відрізняються кількістю цільового продукту: *A. terreus* 20 продукує – 9,56 мг/г, а *A. terreus* 4 – 9,7 мг/г. Маючи майже ідентичні поживні середовища та кількість синтезованого статину та однаковий час культивування, буде важко зробити висновок про перевагу одного з продуцентів. Тому потрібно порівняти вартості поживних середовищ запропонованих м/о.

Дані про вартість поживних середовищ представлених продуцентів наведено в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів ловастатину

Продуцент	**Компоненти поживного середовища, г/л**	**Ціна компонента, грн/кг**	**Вартість компонента (грн) на 1 л середовища**	**Джерело**
A. terreus 20	вівсяні висівки – 50	40	2	1
	глюкоза – 11	57,6	0,63	2
	гліцерин -16	16,5	0,26	3
	$MgSO_4$ – 0,75	30	0,023	4
	$(NH_4)_2HSO_4$ – 2,3	18	0,041	5
	KH_2PO_4 – 2	43,5	0,087	6
	мальтоза – 5	23	0,115	7
	Вартість 1 л середовища – 3,16 грн			
A. terreus 4	пшеничні висівки – 50	1,7	0,085	8
	глюкоза – 11	57,6	0,63	2
	гліцерин -16	16,5	0,26	3
	$MgSO_4$ – 0,75	30	0,023	4
	$(NH_4)_2HSO_4$ – 2,3	18	0,041	5
	KH_2PO_4 – 2	43,5	0,087	6
	мальтоза – 5	23	0,115	7
	Вартість 1 л середовища – 1,24 грн			

Примітка. Ціни наведено станом на грудень 2023 року:

1. https://pekar-konditer.com.ua/uk/otrubi-ovsyanye-kozub-25-kg-optom;
2. https://www.systopt.com.ua/ru/item-glyukoza;
3. https://flagma.ua/uk/glicerin-o12125543.html;
4.https://reaplus.com.ua/suha/magnj-srchanokislij?gclid=Cj0KCQiA-oqdBhDfARIsAO0TrGGxhYL7dhSiYDgaHfy1Bm3T64024HhHsnohoTyaw8z8abWZEH1M5t0aAprgEALw_wcB ;
5.https://prom.ua/ua/p469050-sulfat-amoniyu-amonij.html?&primelead=MS42;
6.https://flagma.ua/monokalievy-fosfat-monokaliya-fosfat-kaliy-o2810200.html ;
7. https://soda.kiev.ua/ua/p376309244-patoka-maltoznaya.html ;
8. https://flagma.ua/uk/prodam-vysivky-pshenychni-o13770656.html

Порівнюючи ціни поживних середовищ, можна дійти висновку, що меншовартісним є культивування *A. terreus* 4, яке коштує 1,24 грн/л, що на 1,92 грн дешевше від *A. terreus* 20. Але, щоб остаточно порівняти та впевнитися у виборі продуцента порахуємо умовну вартість 1 г ловастатину та занесемо дані в таблицю 5.3.

Таблиця 5.3

Умовна вартість 1 г ловастатину

Біологічний агент	**Вартість 1 л середовища, грн**	**Кількість цільового продукту, г/л**	**Умовна вартість 1 г ловастатину, грн/г**	**Тривалість культивування, год**	**Кількість утвореного ловастатину на годину, г/год**
A. terreus 20	3,16	9,56	0,33	224	0,042
A. terreus 4	1,24	9,7	0,127	224	0,043

Проаналізувавши наведені дані в таблицях 5.1 і 5.2 було зроблено узагальнену таблицю 3.3, в якій продуцентів ловастатину було розподілено за їх продуктивністю, що дає змогу вибрати найбільш вдалий продуцент дивлячись на співвідношення ціни поживного середовища і кількості виробленого цільового продукту. Дані, наведені у табл. 5.3, засвідчують, що умовна вартість ловастатину, синтезованого штамом *A. terreus* 4 (0,127 грн/г) є меншою за *A. terreus* 20 (0,33 грн/г).

Тому порівнявши всі данні, можна дійти висновку, що *A. terreus* 4 є найбільш продуктивним мікроорганізмом, тому що виробляє більшу кількість

цільового продукту ніж *A. terreus* 20, але маючи при цьому нижчу вартість поживного середовища та умовну вартість ловастатину, що буде вигідним при масштабному виробництві препарату.

5.2. Обгрунтування етапів виділення та очистки субстанції для одержання ловастатину

Проаналізувавши існуючі методи виділення й очистки ловастатину, можна виділити головні технологічні етапи:

1. Сушіння субстрату.
2. Подрібнення.
3. Екстрагування за допомогою ацетонітрилу.
4. Фільтрування екстракту.
5. Упарювання екстракту.
6. Кристалізація.
7. Відділення кристалів центрифугуванням.
8. Сушіння кристалів у вакуум-сушарці.
9. Подрібнення кристалів на молотковій дробарці.
10. Пакування, маркування і відвантаження висушеного ловастатину.

5.2.1. Обгрунтування вибору способу відділення біомаси

Для культивування *A. terreus* 4 застосовують твердофазну ферментацію. Культивування в твердому стані передбачає ріст мікроорганізмів у шарах із вологими твердими частинками, між частинками яких є мінімум вільної води, тому для виділення та очищення субстанції, спочатку потрібно висушити отриманий субстрат.

Різниця між багатьма видами сушарок полягає в механізмі видалення вологи, а також у розмірах і потужностях.

Процеси сушіння класифікуються як прямі та непрямі, де кондуктивне нагрівання є непрямим, а конвективне – прямим.

Прямі сушарки передають тепло до матеріалу шляхом конвекції. Теплоносій змушений мати прямий контакт з матеріалом, який потрібно висушити. Потік гарячого повітря або інертного газу служить

теплоносієм, який обдувається або циркулює навколо та всередині матеріалу. Це гаряче повітря переносить і постачає приховане тепло для випаровування поглиненої вологи. Потім волога, що випаровується, поглинається повітрям, що видувається.

Завдяки своїй ефективності сушарки прямого та безперервного дії є найпоширенішою конфігурацією сушарок у промисловій практиці. Їх ефективність теплопередачі вища порівняно з непрямими сушарками. Однак вони мають вищі експлуатаційні витрати та можуть мати підвищені втрати енергії.

Непрямі сушарки використовуються для сушіння чутливих продуктів, таких як фармацевтичні продукти та горючі матеріали, оскільки потік повітря, що циркулює в продукті, відносно низький. Ці сушарки запобігають ризику забруднення під час процесу. Вони також використовуються для періодичної сушіння відносно невеликих обсягів виробництва.

Сушарки періодичної дії можуть мати конвеєрні системи, де деталі проходять через перетинчасті стрічки, які дозволяють нагрітому повітрю обтікати деталі через полотна в сушарці. Сушарки періодичної дії використовуються у відносно невеликих обсягах виробництва. Типовими формами сушарок періодичної дії є лоткові сушарки, вакуумні, барабанні або роторні сушарки.

Сушарки безперервної дії мають дуже високу продуктивність, що дозволяє обробити великий об’єм матеріалу за короткий час. Це реалізується в економії виробничого процесу, оскільки партії можна подавати без необхідності змінювати елементи керування сушарки (Katsifas, Giannoutsou, Lambraki, Barla & Karagouni, 2004).

Згідно з розрахунками, річна потужність виробництва ловастатину становить 9,46 м^3 культуральної рідини, що є достатньо невеликим об’ємом, отже для процесу сушіння можна обрати сушарки періодичної дії. Щоб обрати відповідну сушарку, розглянемо декілька її видів.

Лоткові сушарки — найпростіший тип промислових сушарок; вони мають недорогу початкову вартість і займають менше місця. Вони прості в експлуатації та обслуговуванні. Однак час висихання зазвичай тривалий.

Вакуумні сушарки застосовуються для термочутливих, гігроскопічних, горючих і сипучих продуктів. Вони використовуються в харчових продуктах і фармацевтичних продуктах для запобігання розпаду поживних речовин при високих температурах. Вони ефективно видаляють велику кількість вологи та швидко висихають.

Ліофільна сушка (або ліофілізація) передбачає заморожування матеріалу, який необхідно висушити, і піддавання його вакууму. Застосовується для продуктів, які різко руйнуються або змінюються при високих температурах. Зберігає біологічну активність і хімічні властивості матеріалу. Він використовується в харчових продуктах і фармацевтичних продуктах для збереження вмісту поживних речовин і активних інгредієнтів. Він також використовується в біологічних зразках, таких як кров, тканини та білки. Однак для завершення сублімаційної сушки потрібно багато часу (Katsifas, Giannoutsou, Lambraki, Barla & Karagouni, 2004).

Проаналізувавши вищевказану інформацію, можна дійти висновку, що найкращим варіантом для висушування субстрату, буде саме вакуумна сушарка, так як вона використовується для термочутливих продуктів.

5.2.2. Обгрунтування способу подрібнення

В залежності від класу подрібнення, подрібнювачі умовно поділяють на дробарки крупного, середнього, мілкого здрібнення та млини тонкого та надтонкого помелу.

Вибір дробарок та млинів проводять в залежності від класу подрібнення, способу подрібнення, ступеня подрібнення, фізико-механічних властивостей матеріалу (твердість, крихкість, абразивність, вологість, а також характеристики продукту подрібнення (однорідність, дисперсність, вологість, вміст намелу та інші).

До найпоширеніших дробарок давильної дії належать валкові дробарки. Робочою частиною їх є горизонтальні валки, кількість яких може бути різною: найчастіше дробарки мають пару валків. Такі дробарки мають просту конструкцію, дешеві в обслуговуванні та ремонті та мають низькі питомі витрати електроенергії. Проте, вони застосовуються зазвичай для крупного і середнього дроблення. Для дрібного подрібнення застосовують молоткові дробарки та дезінтегратори.

Молоткова дробарка складається з корпусу, який футерований стальними відбійними плитами, на валу вставлені диски, між якими шарнірно підвішені молотки. Матеріал подрібнюється під дією ударних навантажень молотків. Частинки матеріалу, які досягли певного розміру проходять через колошникову решітку та виводяться з дробарки.

Дезінтегратори належать до дробарок, подрібнення в яких ґрунтується на принципі вільного удару. Перевагами таких дробарок є простота, висока продуктивність та надійність. Значним недоліком дезінтеграторів та дисмембраторів є швидке зношення пальців барабанів, а їх заміна є трудомісткою операцією та значним пилоутворенням і необхідністю встановлення пристроїв, що захищають ротори від потрапляння в них твердих частинок (Тертишний, Опарін & Рябік, 2015).

Отже, для процесу подрібнення обираємо молоткову дробарку.

5.2.3. Обгрунтування процесу екстрагування за допомогою ацетонітрилу

Автори Gulyamova та ін., у свої роботі, представляють власну технологію екстрагування ловастаину ацетонітрилом.

Ацетонітрил є надзвичайно вигідним розчинником для багатьох різних видів промислового та лабораторного застосування. Його низька токсичність і горючість роблять його ідеальним розчинником для обробки та зберігання в лабораторії. Його висока розчинність також дозволяє йому легко розчиняти широкий спектр матеріалів, таких як масла, смоли, гума та інші органічні сполуки. Крім того, його низька в’язкість робить ацетонітрил чудовим для

використання в методах хроматографії, оскільки він має здатність відокремлювати різні молекули одна від одної на основі полярності або розміру.

Так як, в цій статті описується культивування обраним продуцентом - *A. terreus* 4, то візьмемо цю роботу за основу.

5.2.4. Обгрунтування способу фільтрування екстракту

Фільтрування — процес видалення з рідини зважених часток. Таке видалення може бути – зваженими твердими частинками з рідкої рідини або газу/повітря.

У фармацевтичній промисловості широко використовуються різні системи фільтрації. Поверхнева фільтрація, глибинна фільтрація та ультрафільтрація — це системи, які використовуються в промисловості для різних цілей, і кожна система фільтрації має ряд переваг. Нижче наведено ключову інформацію про кожен тип фільтрувальної системи.

Системи поверхневої фільтрації призначені для утримання частинок на поверхні фільтрованого матеріалу. Ці частинки накопичуються з часом, коли триває фільтрація, і утворюють твердий шар матеріалу на рівні поверхні. Цей шар, який часто називають «шар коржа», допомагає підвищити ефективність фільтра під час його формування. У той час як початкова швидкість фільтрації при використанні поверхневих фільтрів становить лише близько 55%, після формування «шару коржа» швидкість фільтрації збільшується до 100 %. У процесі поверхневої фільтрації з часом відбудеться зменшення потоку, оскільки речовина продовжує накопичуватися в системі, що потребує періодичного обслуговування. Систему потрібно буде зупинити, щоб дати змогу очистити фільтр.

У системі глибинної фільтрації матеріал протікає довгим шляхом через кілька різних фільтруючих шарів, перш ніж вийти з фільтрувальної системи. Цей процес фільтрації використовується для видалення частинок, розчинних матеріалів і колоїдних матеріалів із рідини. На початку шляху спочатку видаляються більші частинки. Потім, коли матеріал протікає через

глибинний фільтр, відфільтровуються все дрібніші частинки. Однак вони можуть використовуватися протягом більш тривалого періоду часу, ніж системи поверхневих фільтрів.

Іншим поширеним типом системи фільтрації, що використовується у фармацевтичній промисловості, є ультрафільтрація. Ці системи зазвичай використовуються, коли пори фільтра повинні мати розмір 0,01 мікрон. Ультрафільтрація не тільки видаляє дрібні частинки з потоку матеріалу, вона також видаляє деякі віруси та інші мікроорганізми, які можуть бути присутніми в потоці, наприклад бактерії та найпростіші (Hancock, 2016). До процесу ультрафільтрації застосовуються мембранні фільтри.

Процес мембранної фільтрації – це фізичний метод розділення, який характеризується здатністю розділяти молекули різних розмірів і характеристик. Його рушійною силою є різниця тиску між двома сторонами спеціальної мембрани. Мембранна технологія дозволяє знизити загальні витрати на виробництво та одночасно підвищити якість продукції (van Reis & Zydney, 2001).

Отже, для процесу фільтрацію будемо використовувати мембранні фільтри.

5.2.5. Обгрунтування вибору процесу упарювання

Технологія випаровування використовується в будь-якому процесі, який вимагає концентрації потоку шляхом видалення води або іншого розчинника. Процес випаровування енергоємний; будь-який підхід до проектування системи випарника має брати до уваги філософію рекуперації тепла та загальне використання комунальних послуг кінцевої конструкції системи. Характеристики продукту також необхідно враховувати при проектуванні системи; багато характеристик продукту можуть бути змінені в процесі випаровування.

Існує кілька різновидів конструкцій випарників, які зазвичай використовуються в різних галузях промисловості. Вибір відповідної конструкції базується на багатьох факторах, які враховують ефективність

системи та відповідне використання конкретного типу випарника для підтримки кінцевих необхідних характеристик продукту.

Найпопулярнішими апаратами для упарювання є вакуумні. Вакуум-випарні апарати вигідно відрізняються своєю ефективністю та широким спектром застосувань у порівнянні з іншими методами випарювання. Вони працюють при низькому тиску, що дозволяє випаровувати рідину при низьких температурах порівняно з іншими методами. Це особливо важливо для випарювання теплочутливих речовин. Також вакуум-випарні апарати дозволяють точно контролювати тиск та температуру, що важливо для оптимізації процесів випарювання та уникнення деградації речовин.

Тому для процесу упарювання, будемо використовувати вікуум-випарні апарати.

5.2.6. Обгрунтування вибору процесу кристалізації

Кристалізація біофармацевтичних препаратів може бути проблематичною, оскільки, оскільки біосинтез цих сполук дуже важко контролювати, вони можуть містити значну кількість домішок, які необхідно видалити. Насправді домішки можуть призвести до змін у властивостях препарату, що може значно знизити його ефективність або навіть поставити користувача під загрозу (Simone, Zhang & Nagy, 2015).

Випарні кристалізатори застосовуються для кристалізації солей, розчинність яких мало змінюється при зміні температури. При цьому процес здійснюється шляхом видалення частини розчинника при випарюванні розчину за рахунок підведення тепла, переважно з граючою парою. Випарно-кристалізаційні процеси можуть вимагати значних енергетичних витрат, особливо для випаровування великих обсягів розчинника, що може призводити до великих тепловитрат від системи, особливо при високих температурах.

Велику категорію апаратів для кристалізації представляють вакуум-кристалізатори, де охолодження розчину відбувається через адіабатичне випаровування частини розчинника. Вакуумні кристалізатори відрізняються великою продуктивністю, конструктивно прості, вигідні з енергетичної точки

зору, не мають громіздкого приводу, можуть виготовлятися з будь-яких, в тому числі володіють малою теплопровідністю. Найбільшого поширення набули багатокорпусні вакуум-кристалізатори, що дозволяють більш економно використовувати тепло (Гіріч, Єльцова & Рябік, 2010). Вакуумні кристалізатори використовують вакуум для швидкого та ефективного випаровування розчинника з розчину. Це дозволяє швидше формувати кристали та збільшити продуктивність процесу, що сприяють отриманню продукту високої чистоти. Також ці апарати працюють при низьких температурах, що дозволяє зберігати теплочутливі речовини, зменшуючи тепловитрати та запобігаючи їх розкладанню.

Отже, для процесу кристалізації оптимальним варіантом буде вакуум-кристалізатор.

5.2.7. Обгрунтування вибору відділення кристалів

Відділення кристалів від рідини може виконуватися різними способами залежно від конкретного процесу та властивостей системи. Нижче буде представлено декілька способів відділення.

Метод відстоювання використовується для відділення кристалів від рідини на основі їхньої різниці в густині. Процес полягає у тому, що розчин із кристалами залишається нерухомим протягом певного часу, дозволяючи кристалам осідати або відстоюватися від рідини під впливом гравітації. Важливою частиною цього процесу є створення умов, при яких кристали можуть осідати, утворюючи в основному стійкий осад. Але цей метод є достатньо тривалим і не підходить для нашого виробництва.

Використання центрифуги дозволяє відокремити кристали від рідини шляхом обертання системи з великою швидкістю. Кристали виштовхуються на стінки центрифуги, а рідина залишається в центрі. Відцентрова фільтрація є одним з найбільш ефективних і економічних методів розділення твердої фази від рідини. Оскільки відцентрове поле може створити величезний перепад тиску через фільтраційний осад, воно має багато переваг, таких як висока швидкість фільтрації, низька вологість осаду тощо (Hwang & Chou, 2008).

Тому для відділення кристалів від маточного розчину, використовуватемо центрифугування.

5.3. Обґрунтування форми випуску ЛЗ

Натуральний продукт, ловастатин, сам по собі не є засобом, що знижує рівень холестерину; скоріше він перетворюється *in vivo* у форму гідроксикислоти, яка інгібує 3-гідрокси-3-метил-глутарил-коензим А редуктазу та блокує біосинтез холестерину.

Звичайне пероральне дозування призводить до коливань рівня ліків у плазмі, оскільки метод не забезпечує контролю над доставкою ліків. Ловастатин є погано розчинним препаратом із високою проникністю, і швидкість його перорального всмоктування часто контролюється швидкістю розчинення в шлунково-кишковому тракті .

Крім того, ловастатин швидко метаболізується в кишечнику та печінці, і тому він має низьку біодоступність при пероральному прийомі (~5%).

Мевакор® — це таблетована форма ловастатину з негайним вивільненням. Форма проліків вивільняється в шлунку, де розчинна форма піддається оборотній реакції між формами лактону та гідроксикислоти (ГК). Перетворення та всмоктування обох форм відбувається по всьому шлунково-кишковому тракту. Обидві форми досягають портального кровообігу і екстрагуються печінкою Щоб уникнути наслідків індивідуальних відмінностей і запобігти швидкому виведенню агента, використання системи доставки ліків із пролонгованим вивільненням є реальною тактикою (Hubert, Chadwick, Wacher, Coughlin, Kokai-Kun & Bristol, 2018).

Таблетки ловастатину готуються з додаванням крохмалю та сахарози, які використовуються як допоміжні матеріали. Звичайний кукурудзяний крохмаль піддається термічній обробці, щоб можна було покращити адгезію та розпад крохмалю в таблетці.

Крохмаль є основною допоміжною речовиною для пероральних твердих лікарських форм, він полімеризується молекулою глюкози і використовується

як адгезив, розчинник та дезінтегруючий агент, його дешево та легко отримати, він безпечний для організму людини (Pat. CN104434836A).

Використання таблетованої форми дозволяє точно дозувати ловастатин, що важливо для забезпечення ефективного контролю рівня холестерину у пацієнтів. Покриття оболонкою забезпечує захист активного інгредієнту від впливу зовнішніх факторів, таких як світло, волога та інші шкідливі фактори, що може поліпшити стабільність препарату та зберігати його ефективність протягом тривалого часу.

Такий підхід також дозволяє полегшити прийом препарату пацієнтом, забезпечуючи йому комфорт та сприяючи збереженню властивостей лікарського засобу. В цілому, таблетки покриті оболонкою є оптимальним вибором для забезпечення ефективного та зручного лікування гіперхолестеринемії у пацієнтів.

5.4. Обґрунтування вибору первинної упаковки ЛЗ

Найважливішою вимогою є збереження перевіреного та схваленого продукту до моменту його використання користувачем. Крім того, пакувальні матеріали повинні завжди відповідати специфікаціям (схваленням), повідомленим і збереженим уповноваженим органам.

Під первинною упаковкою розуміють усі пакувальні матеріали, які контактують із продуктом. Це пластикові та алюмінієві плівки, скло різного дизайну та якості, пластикові та еластомерні кришки, труби з алюмінію, пластмас та композитних матеріалів, контейнери з пластику, алюмінію та листового металу та їх кришки.

Основні пакувальні матеріали, які використовуються у фармацевтичній промисловості, включають пластик, скло та метал. Пластикові контейнери за останні пару років набули популярності. Вони мають багато переваг перед скляною та металевою тарою, зокрема те, що вони дешевші, гнучкі, менш крихкі та їх легко стерилізувати.

Таблетки часто поміщають у блістери, так як в фармацевтичній промисловості вони є економічно-ефективним пакувальним рішенням, яке долає декілька поширених перешкод, таких як:

- збереження лікувальних якостей продукту;
- відповідність нормативним вимогам;
- захист ліків від кисню, вологи та забруднення (Liu & ODonovan, 2023).

Спираючись на вищевказану інформацію, для первинного пакування таблеток ловастатину, оберемо блістери.

5.5. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря)

Підготовка виробничого персоналу

Підготовка виробничого персоналу проводиться згідно СТП 00481212-03-02- 2001 «Гігієнічні вимоги до персоналу і використання спеціального одягу».

Підготовка технологічного одягу

Підготовка технологічного одягу проводиться відповідно ГСТУ 64-8-2000 «Належна виробнича практика. Комплекти одягу для працюючих у чистих приміщеннях виробництв медичної та мікробіологічної промисловості. Загальні технічні вимоги». Підбір комплектів одягу проводять відповідно ГСТУ 64-9-2000 «Належна виробнича практика. Комплекти одягу для працюючих у чистих приміщеннях виробництв медичної та мікробіологічної промисловості. Види і комплектність».

Підготовка дезинфікуючих засобів

Для забезпечення асептичності процесу культивування перед початком процесу технологічне обладнання, що використовується миють та дезінфікують. До миючих та дезинфікуючих засобів існують наступні вимоги:

1. Повинні мати високу протимікробну активність відносно всіх збудників інфекційних, вірусних і паразитарних захворювань.
2. Мати невисоку токсичність для людей, не пошкоджувати шкіру і слизові оболонки.
3. Бути дешевими.

4. Не мати запаху і властивостей барвників.

5. Швидку дію та тривалість дії.

6. Не повинні псувати предмети, що підлягають дезінфекції.

Тривале використання будь-якого дезінфікуючого засобу приводить до утворення стійких штамів. Тому дезінфікуючий засіб повинен змінюватися через кожні 14 днів.

Для миття частин обладнання, які забруднені сторонніми речовинами передбачено використовувати різні миючі засоби, а саме «Дезосепт».

«Дезосепт» — комбінований препарат для дезінфекції різних видів технологічного обладнання.

Суттєві переваги препарату:

- широкий спектр антимікробної дії: препарат має високу бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, спороцидну та фунгіцидну дію;

- сильна біоцидна та спороцидна дія завдяки високій окислюючій здатності надоцтової кислоти;

- відсутність ефекту призвичаєння мікроорганізмів до препарату;

- швидкість і надійність мікробіологічної дії внаслідок специфічної високої швидкості дифузії надоцтової кислоти через кліткову мембрану;

- препарат не викликає осадження білків;

- препарат добре розчиняється у воді, розчини препарату не піняться;

- широкий температурний інтервал застосування, в тому числі при низьких температурах;

- низькі концентрації робочого розчину препарату та низькі температури застосування;

- препарат на поверхні обладнання розкладається на нешкідливі продукти;

- залишки препарату легко та швидко змиваються водою;

- продукти розкладу надоцтової кислоти — оцтова кислота, вода, кисень – не токсичні та не шкідливі і не забруднюють навколишнього середовища.

Представлені розчин відповідає усім вимогам до дезінфікуючих засобів. Найголовніше те, що він не шкодять здоров'ю людини та відносно дешевий і зручний у використанні. Не потребує додаткових зусиль у приготуванні та використанні.

Для обробки рук персоналу використовують стандартну гігієнічну обробку рук. Гігієнічна обробка рук включає звичайне миття рук водою зі звичайним милом і гігієнічну антисептику рук, тобто втирання антисептика без застосування води (Ігнатенко, 2008).

Підготовка вентиляційного повітря

Для підтримання необхідних параметрів повітряного середовища як в жилих, так і у виробничих приміщеннях існують різні системи вентиляції, що диференціюють: за способом надходження повітря (природна й штучна), місцем дії (місцева і загальна), призначенням (припливна, витяжна, припливно-витяжна). Виробничі приміщення фармацевтичних та медичних підприємств обладнують системами турбулентної і ламінарної вентиляції.

У системі подачі вентиляційного повітря у виробничих приміщеннях класів чистоти С і D прийнято застосовувати турбулентний повітряний потік. Повітря в них подається системою кондиціонування через встановлені на стелі розподільників повітря. Усередині приміщення додатково можуть установлюватися пересувні рециркуляційні повітроочисники, що забезпечують швидке й ефективне очищення повітря за рахунок механічної фільтрації його через фільтр з ультратонких волокон і ультрафіолетової радіації.

Проектування турбулентно вентильованих чистих приміщень відрізняється від проектування звичайних приміщень з кондиціонуванням повітря деякими особливостями:

— Подавання значно більших об'ємів повітря;

— Використовуються високоефективні повітряні фільтри, які зазвичай встановлюють в місцях подачі повітря в чисте приміщення;

— Організація руху повітря всередині чистого приміщення повинна сприяти видаленню забруднень;

— У чистому приміщенні створюється надлишковий тиск для того, щоб повітря рухалось в бік сусідніх менш чистих ділянок;

— Конструкційні та оздоблювальні матеріали повинні бути високої якості.

При виробництві стерильної продукції використовують системи ламінарної вентиляції, що забезпечують спрямовані до робочої зони приміщення потоки стерильного повітря (які попередньо проходять через фільтри різного ступеня очищення) і витискують всі механічні і мікробні контамінанти, що знаходяться в повітрі приміщення.

Системи ламінарного повітряного потоку повинні забезпечувати рівномірну швидкість руху повітря: близько 0,30 м/с для вертикального і близько 0,45 м/с для горизонтального потоків.

Приміщення з ламінарним потоком — приміщення, у яких повітря подається в напрямку до робочої зони через фільтри, що займають всю стіну або стелю, і видаляється через поверхню, протилежну входові повітря. Розрізняють дві системи: вертикальний ламінарний потік, при якому повітря рухається вгору через стелю і виходить через ґратчасту підлогу, і горизонтальний ламінарний потік, при якому повітря надходить через одну, а виходить через протилежну перфоровану стінку.

Повітряний потік такого типу здатний відразу видалити аерозольні забруднення, джерелами яких є персонал і процеси виробництва, тоді як система з турбулентної вентиляцією заснована на змішуванні і розведенні самих забруднень (Джеджула, 2016).

Тепер розглянемо вимоги щодо вентиляції виробничих поміщень, регламентовані санітарними нормами безпеки України.

1. Примусова вентиляція повинна відповідати правилам пожежної безпеки;

2. Небезпечні для здоров'я речовини повинні видалятися без допуску до робочої зони співробітників;

3. Заводська витяжка для виробничих приміщень повинна обов'язково паспортизуватися, мати гігієнічний та пожежний сертифікат щодо безпеки матеріалів, з яких виготовлені деталі обладнання;

4. Повітропроводи повинні бути зроблені з некорозійних матеріалів, бути покриті оцинкованим металом або порошковою фарбою. Покриття горючою фарбою повинно бути менше 0,2 мм завтовшки.

5. Також норми витяжної вентиляції припускають, що повітряні канали, виводять шкідливі або вибухонебезпечні речовини можуть перетинатися з теплоносіями тільки тоді, коли цього температура теплоносія буде нижчою за температуру займання речовини більше, ніж на 20 °С.

6. Зимою в виробничому приміщенні не повинно бути холодніше 5 °С у неробочу годину, і холодніше 10 °С у присутності персоналу. У теплу пору норма для цеху – температура повітря на вулиці. Якщо в цеху спекотніше, ніж на 4 °С, завдання вентиляції та кондиціонування – охолоджувати повітря. Рівень важливості повітря та швидкість переміщення повітряних мас при цьому не нормуються.

7. На шкідливих виробництвах важливо підтримувати норми ГДК (гранично допустимої концентрації).

8. Загальний рівень шуму всередині приміщення для виробничих операцій не повинен перевищувати 110 дБ. Тому краще вибирати припливні та витяжні системи для виробництва з низьким рівнем шуму та не економити на цьому.

Належна виробнича практика орієнтована на застосування спеціальних систем очистки (стерилізації), повітря і які використовують принцип високоефективної фільтрації, повітря що подається в приміщення за допомогою HEPA фільтрів (High Efficiency Particulate Air/Particle Absorption) (Поводзинський & Шибецький, 2017).

5.6. Обґрунтування вибору підготовки води

Невід'ємною частиною виробництва будь-якого підприємства фармацевтичної промисловості є підготовка (очищення) різних типів води. Це обумовлено широким спектром напрямків застосування води.

В залежності від характеру конкретного виробництва (форми готової продукції) на фармацевтичному підприємстві можуть використовуватися різні типи води:

- вода питна;
- вода знесолена (демінералізована);
- вода очищена (*Aqua purificata)* (дистильована);
- вода для ін'єкцій (*Aqua pro ingectionibus)* (апірогенна).

Якість кожного типу води регламентується відповідною нормативною документацією. Вимоги до води фармацевтичного призначення регламентуються Фармакопейними статтями "Вода очищена" ФС 42-2619-97 і "Вода для ін'єкцій" ФС 42-2620-97, тому вона носить назву вода фармакопейної якості.

Вода питна. Оскільки воду для фармацевтичних цілей одержують з води питної, джерелом якої є природна вода, важливим елементом технології є звільнення її від присутніх домішок. Природна вода містить наступні домішки: розчинені тверді компоненти (неорганічні солі, іони кальцію, магнію, натрію, хлору, іони сірчаної і вугільної кислот (електроліти); гідросуспензії (зважені у воді мікрочастинки глини, оксидів заліза і забарвлюючі матеріали; розчинені органічні речовини такі, як жири, цукрові комплекси, інші складні органічні сполуки; мікроорганізми; колоїдні речовини (зважені тверді частки у вигляді колоїдів, що утворюють гідроксид заліза, кремнієва кислота і органічні речовини; розчинені гази (кисень, азот, вуглекислий газ, сірководень, метан і інші гази); мікрочастинки (пил, іржа; пірогенні речовини, що знаходяться у воді в розчиненому стані або у виді колоїдної системи і за хімічною структурою являють собою органічні речовини з молекулярною масою від 30000 до 300000.

Кількість домішок природної води залежить від джерела води і може змінюватися в різні періоди року.

Значна частина цих речовин видаляється на стадії одержання питної води, яка може постачатися з міської мережі або її джерелом може бути природна вода з артезіанських свердловин.

Для одержання води фармакопейної якості необхідно проводити обробку води питної яка поступає на підприємство. При цьому вода питна повинна бути безпечна в епідемічному відношенні, нешкідлива по хімічному складу та мати добрі органолептичні властивості. За мікробіологічними показниками вода питна повинна відповідати вимогам НТД. Безпеку води в епідемічному відношенні визначають загальним числом мікроорганізмів і числом бактерій групи кишкових паличок (БГКП). По вмісту хімічних та біологічних речовин по органолептичним та мікробіологічним показникам вода питна повинна відповідати вимогам НТД (ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая», ДСанПіН №136/19400 „Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості господарсько-питного водопостачання"). затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я України від 23 грудня 1996 р. №383.

Вимоги до води питної включають:

1. безпечність в епідеміологічному відношенні;
2. безпечність хімічного складу;
3. сприятливі органолептичні показники;
4. радіаційну безпечність.

Вода питна застосовується виключно для господарсько-побутових цілей працівників виробництва і використовується в технологічному процесі лише на деяких стадіях (у випадках, коли процес проводиться в нестерильних умовах і використання води на даній стадії допускається НТД). Однак вона є джерелом для отримання води всіх інших типів (за винятком тих рідких випадків, коли як джерело береться природна вода і її очищення до норм води питної проводиться безпосередньо на підприємстві).

Демінералізована вода (знесолена) використовується для миття склодроту, ампул, допоміжних матеріалів та для живлення аквадистиляторів при отриманні води очищеної і води для ін'єкцій.

Вода очищена (дистильована) може використовуватися безпосередньо в технологічному процесі отримання лікарських засобів, як на стадіях основного виробництва, так і для проведення ряду допоміжних робіт у випадках, коли до процесу пред'являються вимоги підвищеної стерильності. Необхідно зауважити, що на воду дистильовану діє відповідний ГОСТ 6709 – 72 "Вода дистиллированая" у відповідності з яким до води дистильованої відносять воду, яку отримують у дистиляційних (перегонних) апаратах і яка використовується для аналізу хімічних реактивів і приготування розчинів реактивів.

В якості загального зауваження потрібно відмітити, що контроль якості води повинен враховувати вимоги стандартів:

ДСТУ ISO 5667 – 1 - 2001 Якість води. Відбирання проб. Частина 1. Настанови щодо плану програм відбирання проб.

ДСТУ ISO 5667 – 2 - 2001 Якість води. Відбирання проб. Частина 2. Настанови щодо методів відбирання проб.

ДСТУ ISO 5667 – 3 - 2001 Якість води. Відбирання проб. Частина 3. Настанови щодо зберігання та поводження з пробами.

ДСТУ 4077 - 2001 Якість води Визначення pH.

Вода очищена використовується для технологій виробництва неін'єкційних лікарських засобів. Вона повинна відповідати вимогам хімічної чистоти і захищена від наявності і присутності продуктів розвитку мікроорганізмів. У воді очищеній повинні бути відсутніми нітрати, нітрити, відновлювальні речовини, хлориди, сульфати, кальцій, важкі метали. У воді очищеній нормується вміст мікроорганізмів - не більше 100 КУО/мл при відсутності родини *Enterobacteriacea*, *P. aeruginosa, S. aureus*. Джерелом одержання води очищеної є вода питна, що відповідає ДСТУ або СНіПу і використовується в якості живильної. Вода питна очищується з використанням

способів, що включають один з способів - деіонізацію, дистиляцію, іонний обмін, зворотний осмос або цих комбінацію способів (Поводзинський, 2005).

РОЗДІЛ 6. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1) Об’єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 0,46 м^3;

2) Концентрація ловастатину в культуральній рідині ($C_{лов}$) = 9,7 мг/мл;

3) Втрати на стадіях виділення і очищення ловастатину ($W_{втрат}$) = 20 %;

Початкова кількість сухого ловастатину в культуральній рідині складає 0,46*9,7=4,462 кг, а кінцева кількість сухого ловастатину, з урахуванням 20 %-ів втрат, має становити 3,8 кг. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ з/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1 Сушіння						
2	ТП 1.1 Сушіння на вакуум-сушарці	Тверда матриця (65%)	460 кг	-	-	Вакуум-сушарка Продуктивність – 30 кг/год
		Висушена тверда матриця (вологість 2 %)	14,2 кг	1 % (0,14 кг)	14 кг	
ТП 2 Подрібнення						
3	ТП 2.1 Подрібнення на молотковій дробарці	Висушена тверда матриця (вологість 1 %)	14 кг	-	-	Молоткова дробарка Продуктивність подрібнювача – 50 кг/год
		Подрібнена тверда матриця	-	1 % (0,14 кг)	13,8 кг	
		Упакований у поліетиленові пакети ловастатин у вигляді порошку	-	1 % (0,04 кг)	3,8 кг	

ТП 3 Екстрагування						
4	ТП 3.1 Змішування субстрату з ацетонітрилом	Подрібнена тверда матриця	13,8 кг	-	-	Реактор для змішування з ацетонітрилом об’ємом 1 м^3
		Ацетонітрил	368 л (40 мл на 1,5 г субстрату)	-	-	
		Екстракт	380 л	-	-	
ТП 4 Фільтрування						
5	ТП 4.1 Фільтрування екстракту	Екстракт	380 л	10 % (38 л)	-	Мембранний фільтр 0,45 мкм
		Фільтрат	-	-	342 л	Збірник фугату об’ємом 1 м^3
ТП 5 Упарювання						
7	ТП 5.1 Упарювання на вакуум-апараті	Фільтрат	342 л	-	-	Вакуум-упарювач Робоча місткість – 100 л
		Упарений розчин	¼ від 342 л – 85,5 л	1 % (0,85 л)	84,65 л	
ТП 6 Кристалізація						
8	ТП 6.1 Кристалізація на вакуумкристалізаторі	Упарений розчин	84,65 л	-	-	Вакуум-кристалізатор Робочий об’єм – 0,5
		Кристалізований ловастатин	-	2 % (1,69 л)	83 л	
ТП 7 Відділення кристалів						
9	ТП 7.1 Відділення кристалів центрифугуванням	Кристалізований ловастатин	83 л	-	-	Центрифуга 1 000 об/хв
		Кристали ловастатину	41 кг	1 % (0,41 кг)	40,6 кг	
ТП 8 Сушіння кристалів						
10	ТП 8.1 Сушіння на вакуум-сушарці	Кристали ловастатину	40,6 кг	-	-	Вакуум-сушарка Продуктивність – 500 кг/год
		Висушений ловастатин	4 кг (вміст вологи 10 %)	-	4 кг	
ТП 9 Подрібнення кристалів						
11	ТП 9.1 Подрібнення на молотковій дробарці	Висушений ловастатин	4 кг	-	-	
		Подрібнений ловастатин	-	2 % (0,08 кг)	3,92 кг	Молоткова дробарка Продуктивність Подрібнена подрібнювача – 30 кг/год
ПМВ 10 Пакування, маркування та відвантаження						
12	ПМВ 10 Пакування, маркування і відвантаження висушеного ловастатину	Подрібнений ловастатин	3,92 кг	-	-	Ручна упаковка

Закінчення таблиці 6.1

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання ділянки стадій виділення ловастатину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Н-1 Н-9 Н-11 Н-13 Н-15 Н-17	Перистальтичний насос	1	Розхід - від 33 до 2700 л/год, тиск - до 8-15 бар, діаметр шланга - 26 мм https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi/seriya_psf/rotho_psf1
З-2 З-8 З-12	Збірник культуральної рідини та ректор-змішувач об'ємом 1 $м^3$	1	Об'єм – 1 $м^3$, швидкість обертання мішалки – 24-30 об/хв, потужність приводу мішалки – 5,5 кВт, потужність ТЕНів сорочки - 30 кВт температура у робочій ємності - 90° С, габаритні розміри – 1,3х2,75 м. https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/
ПЄ-3 ПЄ-5 ПЄ-7 ПЄ-19 ПЄ-21 ПЄ-23	Переносна ємність	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений пересувними елементами, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 40 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення Dushka.UA| | Замовити реактор, змішувач (dushka-ua.com)
ВСШ-4 ВСШ-20	Вакуумна сушильна шафа	1	Фірма – ILMAX, модель IL1431, робоча температура, °С 0-80, температура довкілля, С +15 ~ +35, витрати е.е на годину кв. 1,5 – 3,3, максимальний об'єм завантаження, до 30 кг, кількість рівнів для піддонів – 20, розміри піддонів (ДхШхВ), мм 585*585*15 +-5, матеріал лотків, стінок камери – сталь нержавіюча, зовнішні розміри камери (ДхШхВ), мм. - 950*780*1480, потужність теплового потоку, кВт – 3, підключення 220 В, 50 Гц. https://ilmax.com.ua/product/sushilnye-shkafy-degidratory?gclid=CjwKCAjw3ueiBhBmEiwA4BhspAmi_0zumiIWmHziq43AU5aenA7OPj5nrhf46E7DlK_OfdX4v7ljchoCEZ4QAvD_BwE

Закінчення таблиці 7.1

МД-6 МД-22	Молоткова дробарка	1	Фірма – Triniti, модель - LS-20, продуктивність - до 40 кг/година, корпус нержавіюча харчова сталь 304, потужність двигуна - 2,2 кВт, обороти - 2840 об/хв, напруга - 220V, товщина помелу регулюється від 50 до 250 меш., вага млина - 25 кг, габарити (см) - 26 х 37.5 х 59. https://prom.ua/ua/p1546288608-molotkovaya-melnitsa-triniti.html
ФК-13	Фільтр капсульний	1	**Капсульний фільтр CHM® Capfil NYLON** Корпус – поліпропілен, розмір пор (мкм) - 0.1, 0.2, 0.45, 0.8, 1.0, 3.0, 5.0, макс. тиск (бар) - 4,1, біологічна безпека - відповідно до вимог UPS (Фармакопеї США) клас VI, характеристики змочування – гідрофобний, стерилізація - автоклавуванням (макс. 134ºC) або гамма-випромінюванням. https://dlu.com.ua/Files/ProductLine/06.pdf
ВВ-14	Вакуум-випарний апарат	1	**Вакуум-випарний апарат МЗС-320** Витрата електроенергії - 2,2 кВт/год, габаритні розміри - 1750х1275х2840 мм, маса устаткування - 900 кг, місткість робоча - 1000 л, місткість повна - 2000 л, вакуум в вручений камері - 0,08 ... 0,085 МПа, робочий тиск: 0,25 МПа.
ВК-16	Вакуум-кристалізатор	1	Вакуум кристалізатор ємнісного типу Робочий об’єм 0,5 $м^3$. Матеріал – сталь Обладнаний сорочкою, насосом, мішалкою датчиками тиску, температури та pH Виробник : «Ebner», Німеччина
Ц-18	Центрифуга	1	**Центрифуга підвісна ФПН-1251Л-07** Внутр. найб. діам. - 1250 мм, частота обертання ротора - 1000 об/хв, фактор поділу – 700, маса завантажений. прод. - 1000 кг, робоча тиск в пневмосистемі - 6-8 $кг/см^2$, робочий об'єм ротора -700 $дм^3$, габаритні розміри (висота) – 5130 мм, маса - 4900 кг. http://snpo.ua/ru/produkts/tsentrifugi/tsentrifugi-podvesnye/

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

ТП 1. Сушіння

ТП 1.1. Сушіння на вакуум-сушарці

Вологий субстрат за допомогою пересувної ємності (ПЄ-3) переносять до вакуумної сушильної шафи (ВСШ-4) та рівномірно розподіляють на піддонах. Далі вологий субстрат піддається сушінню під вакуумом, при температурі 40^{o}С, час роботи установки становить 24 години (з урахуванням підготовки апарату до роботи). Висушений субстрат об'ємом 14,2 кг вологістю ~ 2 %, перекладається в переносну ємність (ПЄ-5), після чого відправляється на *ТП 2.1*. Газоподібні відходи, що утворюються в результаті виходу прогрітого повітря, утилізуються на *ЗВ 11.3*.

ТП 2. Подрібнення

ТП. 2.1. Подрібнення на молотковій дробарці

Висушений субстрат масою 14,2 кг подрібнюють в молотковій дробарці (МД-6) до розміру часток 50 меш. Після закінчення процесу подрібнювання, отриманий продукт масою 13,8 кг передають за допомогою переносної ємності (ПЄ-7) на стадію екстракції *ТП.3.1*.

ТП 3. Екстракція

ТП 3.1. Змішування субстрату з ацетонітрилом

Подрібнений екстракт завантажують до збірника (З-8) та доливають 368 л ацетонітрилу, перемішують за допомогою мішалки на швидкості 180 об/хв. Подають пару у сорочку збірника та нагрівають місткість ректора до 35^{o}С та витримують 2 год. Після завершення екстракції екстракт подають за допомогою перистальтичного насосу (Н-9) на стадію фільтрування *ТП 4.1*.

ТП 4. Фільтрація

ТП 4.1. Фільтрування фугату

Зі збірника (З-10) за допомогою насосу (Н-11) фугат перекачується до капсульного фільтру (ФК-12) з мембраною з розміром пор 0,45 мкм. Після цього процесу, фільтрат за допомогою насосу (Н-13), подається до вакуум-випарного апарату (ВВ-14) для стадії упарювання *ТП 5.1.* Тверді відходи, що утворилися в результаті фільтрації, утилізуються на *ЗВ 11.2*.

ТП 5. Упарювання

ТП 5.1. Упарювання на вакуум-апараті

Отриманий фільтрат об'ємом 338,6 л від *ТП 4.1* упарюють в вакуум-випарній установці (ВВ-14), де за допомогою насиченої пари фільтрат позбавляється зайвої вологи. Фільтрат упарюється при температурі 50-60^{o}С до 1/4 первісного обсягу, тобто до 84,65 л. Далі упарений розчин за допомогою насосу (Н-15) подається в вакуум-кристалізатор (ВК-16) до *ТП 6.1.*

ТП 6. Кристалізація

ТП 6.1 Кристалізація на вакуум-кристалізаторі

Упарений розчин об'ємом 84,65 л від ТП *5.1* подається в вакуум-кристалізатор (ВК-16). В кристалізаторі створюють вакуум та подають в сорочку холодну воду, і знижують температуру до 13-15°С, а потім повільно опускають до 4°С. Кристалізований ловастатин об'ємом 83 л за допомогою насосу (Н-17) надходять до *ТП 7.1*. для відділення кристалів центрифугуванням.

ТП 7. Відділення кристалів

ТП 7.1. Відділення кристалів центрифугуванням

Відділення кристалів від маточного розчину об'ємом 83 л ведеться на центрифузі (Ц-18). Застосовують підвісні центрифуги з нижнім ручним вивантаженням осаду. Для початку центрифугу приводять в рух, і при частоті обертання близько 300 об/хв заливають суспензію кристалівловастатину, далі частоту обертання ротора збільшують до 1 000 об/хв. Відбувається відділення маточного розчину від кристалів ловастатину, через 1-1,5 хвилини від початку

роботи, коли маточний розчин перестане витікати, кристали промивають водою з температурою 35°С, до повного освітлення рідини. Далі ротор зупиняють, відкривають кришку і вручну вивантажують кристали. Після цетрифугування кристали ловастатину, масою 40,6 кг, за допомогою переносної ємності (ПЄ-19) потрапляє у ВСШ-20. Маточний розчин до *ЗВ 11.1*.

ТП 8. Сушіння кристалів

ТП 8.1. Сушіння на вакуум-сушарці

Відділені кристали від *ТП 7.1* за допомогою пересувної ємності (ПЄ-19) переносять до вакуумної сушильної шафи (ВСШ-20) та рівномірно розподіляють на піддонах. Далі кристали піддаються сушінню під вакуумом, при температурі 40^{o}С. Висушені кристали об'ємом 4 кг вологістю ~ 10 %, перекладається в переносну ємність (ПЄ-21), після чого вони відправляються на *ТП 9.1*. Газоподібні відходи, що утворюються в результаті виходу прогрітого повітря, утилізуються на *ЗВ 11.3*.

ТП 9. Подрібнення кристалів

ТП 9.1 Подрібнення на молотковій дробарці

Висушені кристали ловастатину масою 4 кг подрібнюється на молотковій дробарці (МД-22) до розміру часток 0,5 мм. Після закінчення процесу подрібнювання, отриманий продукт масою 3,92 кг передають за допомогою переносної ємності (ПЄ-23) на стадію пакування та маркування *ПМВ 10.*

ПМВ 10. Пакування, маркування і відвантаження висушеного ловастатину

Висушений ловастатин пакують вручну в поліетиленові пакети по 392 г і запаюють за допомогою індукційного приладу. Після чого приготовлені пакети фасуються в картоні коробки по 10 пакетів в коробку, далі коробки відвантажують на склад, де вони зберігаються до часу своєї експлуатації при температурі приміщення 5…10^{o}С. Можливі тверді відходи, а саме браковані тари і засоби маркування, утилізуються на *ЗВ 11.2*

ЗВ 11. Знешкодження відходів стадії виділення та очищення ловастатину

ЗВ 11.1. Знешкодження рідких відходів виробництва ловастатину

Рідкі відходи, що утворюються на *ТП 3.1* та *ТП 7.1* утилізуються в біотенках, де їх перетворення здійснюється за рахунок мікроорганізмів в складі активого мулу.

ЗВ 11.2. Знешкодження твердих відходів виробництва ловастатину

Тверді відходи, що утворюються на *ТП 4.1* і *ПМВ 10* утилізуються за допомогою вторинної переробки (використані тари і браковані матеріали), а також за допомогою компостування (компоненти поживного середовища незадовільної якості і біомаса).

ЗВ 11.3. Знешкодження газоподібних викидів виробництва ловастатину

Газоподібні викиди, що утворюються на *ТП 1.1,* і *ТП 8.1* утилізуються за допомогою крапельного біофільтру, а саме мікроорганізмів, що використовуються в даному обладнанні. Мікроорганізми перетворюють забрудненні речовини на вуглекислий газ і воду, а очищене повітря може піддаватися повторній очистці, або надходити у атмосферу.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ

9.1. Показники якості готового продукту

9.1.1. Мікробіолгічний контроль сухого ловастатину

Посіви здійснюють шляхом відбору 1 г сухого ловастатину та розводять його в 9 мл дистильованої води. Отриманий розчин наносять на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА.

На поверхні поживного середовища візуально визначають відсутність ознак росту сторонньої мікрофлори.

Аналіз проводиться в стерильних умовах в боксі. Посівний матеріал розподіляють по всій поверхні поживного середовища. Посіви на МПА інкубують при 35 °С, а на СА – 24 °С.

В 1 г препарату допустима наявність не більше 10^3 бактерій або 10^2 грибів, також не допускається наявність бактерій роду *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonasaeruginosa* та *Staphylococcusaureus*

9.1.2.Визначення концентрації ловастатину

Для визначення концентрації ловастатину використовувалася високоефективна рідинна хроматографія (препаративна).

Використовувався модуль розділення даних Waters, оснащений УФ-детектором 2487 і контролером системи. Комбінація двох колонок, а саме колонка Inertsil ODS-2, що має розміри 250 × 50 мм, розмір частинок 10 мкм, і Xbridge 30 мм × 50 мм, розмір частинок 5 мкм, були використані для роботи із виділення домішок. Використовували ін’єкційну петлю об’ємом 10 мл, елюент

контролювали при 238 нм, а дані записували за допомогою програмного забезпечення Millenium. Близько 100 г зразка розчиняли в ацетонітрилі і завантажували на препаративну колонку. Суміш води та ацетонітрилу використовували як рухому фазу. Швидкість потоку доводили до 10 мл/хв, а елюент контролювали при 238 нм.

Ідентичність сполуки була підтверджена комерційним зразком ловастатину (Gedeon Richter) як стандарту.

9.1.3. Контроль ваги продукту в одному пакеті (маса брутто)

Для визначення маси одного пакету використовується метод прямого взвішування однієї одиниці продукції на вагах. Маса одного пакету повинна бути 392 г.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

Вітчизняні автори:

1. Бабак О. Я., Візір М. О., Панченко Г. Ю. та ін. Ведення хворого з артеріальною гіпертензією (сучасна практика внутрішньої медицини з невідкладними станами): метод. вказ. для студентів та лікарів-інтернів / упоряд.. – Харків: ХНМУ, 2019. – 24 с.
2. Євтушенко О. М., Нємцова В. Д., Чайковська В. В. (2019). Статини: фармакоекономічні аспекти застосування інгібіторів hmg-coa-редуктази. *Клінічна фармація*. 23(1), 46-55. https://doi.org/10.24959/cphj.19.1476
3. Коваленко В.М., Лутай М.І., Сіренко Ю.М., Сичова О.С. Серцево-судинні захворювання. Класифікація, стандарти діагностики та лікування/За ред. В.М. Коваленка, М.І. Лутая, Ю.М. Сіренка, О.С. Сичова. — 2-ге вид., переробл. та доповн. — К.: МОРІОН, 2016. — 192 с.
4. Коваленко В.М. (2016). Серцево-судинні хвороби: медично-соціальне значення та стратегія розвитку кардіології в Україні. *Український кардіологічний журнал*. Додаток 3. – С. 5–15.
5. Конспект лекцій з курсу "Основні процеси та апарати хімічної технології". Розділ “КРИСТАЛІЗАЦІЯ” для студентів усіх спеціальностей / Укл.: Т.Ю. Гіріч, Т.П. Єльцова, П.В. Рябік. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2010. – 26 с.
6. Мітченко О.І., Лутай М.І. (2007). Дисліпідемії: Діагностика, профілактика та лікування. – К.: Четверта хвиля, – 56 с.
7. Тертишний О.О., Опарін С.О., Рябік П.В. Т Механічні процеси в хімічній технології. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2015. – 215 с.
8. Ханюков О.О. (2020). Роль статинів у профілактиці та лікуванні серцево-судинних захворювань: у фокусі розувастатин. *Здоров’я України 21 сторіччя*. 3(472). – с. 38-39.
9. Коваленко В.М., Лутай М.І., Сіренко Ю.М., Сичова О.С. Серцево-судинні захворювання. Класифікація, стандарти діагностики та лікування/За

ред. В.М. Коваленка, М.І. Лутая, Ю.М. Сіренка, О.С. Сичова. — 2-ге вид., переробл. та доповн. — К.: МОРІОН, 2016. — 192 с.

Іноземні автори:

1. Alarcón, J.; Aguila, S. (2006). Lovastatin production by Pleurotus ostreatus: Effects of the C:N ratio. Z. Natforsch. C. *J. Biosci*., 61(1-2), 95-98. http://dx.doi.org/10.1515/znc-2006-1-217

2. Ames, B.D., Nguyen, C., Bruegger, J., Smith, P., Xu W., Ma S.,……. Tsai S.C. (2012). Crystal structure and biochemical studies of the transacting polyketide enoyl reductase LovC from lovastatin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109(28), 11144-11149. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113029109

3. Amorim NCS, Alves I, Martins JS, Amorim ELC. (2014). Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. *Braz J Chem Eng*. 31(3). 603–12. https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002458

4. Arora, S.; Rani, R.; Ghosh, S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *J. Biotechnol.,* 269, 16-34. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010

5. Ashika S, Kiruthika T, Ashokkumar K, Suraj H, Uthandi S. (2017). Oleaginous yeast from Sago waste water: screening and characterization of *Candida trophicalis* for biolipid production. *Madras Agric J*., 104., 288. http://dx.doi.org/10.29321/MAJ.2017.000062

6. Atli, B.; Yamac, M. (2012). Screening of medicinal higher Basidiomycetes mushrooms from Turkey for lovastatin production. *Int. J. Med. Mushrooms*, 14(2), 149-159. http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i2.30

7. Atlı, B.; Yamaç, M.; Yıldız, Z.; Isikhuemnen, O.S. (2015). Enhanced production of lovastatin by Omphalotus olearius (DC.) Singer in solid state fermentation. *Rev. Iberoam. Micol*., 32(4), 247-251. http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2014.06.008

8. Barrios-González, J., Miranda, R.U. (2010). Biotechnological production and applications of statins. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 85(4), 869-883. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2239-6

9. Barone, E.; Di Domenico, F.; Butterfield, D.A. (2014). Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: Their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochem. Pharmacol*., 88, 605–616. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.030

10. Basak, A., & Basak, S. (2020). Implementing green chemistry for synthesis of cholesterol-lowering statin drugs. *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design,* 577–601. doi:10.1016/b978-0-12-817592-7.00016-2

11. Bazaraa, W.A., Hamdy, M.K., Toledo, R. (1988). Bioreactor for continuous synthesis of compactin by Penicillium cyclopium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 21(4), 192-202. http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.2900565

12. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. (2017). Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*., 135, 146–603.

13. Bhargavi S.D., Praveen V.K., Anil Kumar M., Savitha, J. (2018). Comparative study on whole genome sequences of *Aspergillus terreus* (soil fungus) and Diaporthe ampelina (endophytic fungus) with reference to lovastatin production. *Curr. Microbiol.,* 75(1), 84-91. https://doi.org/10.1007/s00284-017-1353-4

14. Bifulco, M., Endo, A. (2014). Statin: New life for an old drug. *Pharmacol. Res*. 88, 1–2. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.02.003

15. Bizukojc M., Ledakowicz S. (2009). Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by Aspergillus terreus. *Biotechnol. J*., 4(5), 647-664. http://dx.doi.org/10.1002/biot.200800289

16. Bizukojc M., Gonciarz J. (2015). Influence of oxygen on lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 quantitatively studied on the level of individual pellets. *Bioprocess Biosyst. Eng*., 38(7), 1251-1266. http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1366-y

17. Bizukojc M., Ledakowicz S. (2015). Bioprocess engineering aspects of the cultivation of a lovastatin producer *Aspergillus terreus*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*., 149, 133-170. http://dx.doi.org/10.1007/10_2014_302

18. Braga Filho J.A.F., Abreu A.G., Rios C.E.P., Trovão L.O., Silva D.L.F., Cysne D.N. …… Nascimento F.R.F. (2018). Prophylactic treatment with simvastatin modulates the immune response and increases animal survival following lethal sepsis infection. *Front. Immunol*., 9, 2137. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02137

19. Buemi M, Senatore M, Corica F, Aloisi C, Romeo A, Cavallaro E, et al. (2002). Statins and progressive renal disease. *Med Res Rev*. 22:76-84.

20. Cabral M.E., Figueroa L.I.C., Fariña J.I. (2013). Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. *Rev. Iberoam. Micol. 30*, 31–38. DOI: 10.1016/j.riam.2012.09.006

21. Chung K.J., Lee J.K., Lee S.C., Park J.W., Seo D.J. (2001). Method for producing pravastatin precursor, ML-236B. U.S. Patent US 6,204,032 B1, March 28.

22. De Angelis, G. (2004). The influence of statin characteristics on their safety and tolerability. *International Journal of Clinical Practice*, *58*(10), 945–955. https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00355.x

23. Dikshit R., Tallapragada P. (2016). Statistical optimization of lovastatin and confirmation of nonexistence of citrinin under solid-state fermentation by *Monascus sanguineus*. *Yao Wu Shi Pin Fen Xi*, 24(2), 433-440. http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.11.008

24. Doss S.L., Chu C.K., Mesbah M.K., Cutler H.G., Cole P.D., Arrendale R.F., Springer J.P. (1986). Isolation of compactin (a hypocholestrolemic metabolite) from a new source: *Penicillium cyclopium*. *J. Nat. Prod.*, 49(2), 357-358. http://dx.doi.org/10.1021/np50044a036

25. Drugs and Lactation Database (LactMed) [Електронний ресурс]. *National Library of Medicine (US); Bethesda (MD)*: Oct 31, 2018. Simvastatin. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000419/

26. Elaiyaraju P., Partha N. (2012). Biogas production from Sago (Tapioca) wastewater using anaerobic batch reactor. *Energy Environ*. 23(4)., 631–45. https://doi.org/10.1260/0958-305X.23.4.631

27. El-Sayed, A.S.A.; Abdel-Ghany, S.E.; Ali, G.S. (2017). Genome editing approaches: Manipulating of lovastatin and taxol synthesis of filamentous fungi by CRISPR/Cas9 system. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 101(10), 3953-3976. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8263-z

28. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. (1976). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*.;72:323–326. https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80996-9

29. Endo A., Kuroda M., Terahara A., Yoshio T., Chhiro T. (1977) Physiologically active substances and fermentative process for producing the same. US Patent 4,049,495.

30. Endo A., Hasumi K., Yamada A., Shimoda R., Takeshima H. (1986) The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. *J. Antibiot*. 39(11) 1609–1610. DOI: 10.7164/antibiotics.39.1609

31. Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Ho, Y. W., Mohamad, R., Goh, Y. M., & Shokryazdan, P. (2012). Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* Using Agro-Biomass as Substrate in Solid State Fermentation. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1–11. https://doi.org/10.1155/2012/196264

32. Ferri N., Corsini A. (2014). Clinical evidence of statin therapy in non-dyslipidemic disorders. *Pharmacol. Res.,* 88, 20–30. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.06.005

33. Gazzerro P., Proto M.C., Gangemi G., Malfitano A.M., Ciaglia E., Pisanti S., Santoro A., Laezza C., Bifulco M. (2012). Pharmacological actions of statins: A critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol. Rev.*, *64*, 102–146. https://doi.org/10.1124/pr.111.004994

34. Gonyeau, M.J. (2005). Statins and osteoporosis: A clinical review. *Pharmacotherapy.*, 25(2), 228-243. http://dx.doi.org/10.1592/phco.25.2.228.56954

35. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, Daley J, Deedwania PC, Douglas JS, et al. (2003). ACC/ AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina ñ summary article: A report of the American College of

Cardiology/ American Heart Association Task Force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 41, 159-68.

36. Gonyeau, M.J. (2005). Statins and osteoporosis: A clinical review. *Pharmacotherapy.*, 25(2), 228-243. http://dx.doi.org/10.1592/phco.25.2.228.56954

37. Goswami S., Vidyarthi AS, Bhunia B., Mandal T. (2012). A review on lovastatin and its production. *J Biochem Tech*. 4, 581-587. https://jbiochemtech.com/storage/models/article/ecm7ORqhbQqONxf3FoB6uuO83Or7wvYAnAyN7wOiJVO75HU2Wqwrb2zfFLXO/a-review-on-lovastatin-and-its-production.pdf

38. Gulyamova, T.; Ruzieva, D.; Masmetova, S.; Sattarova, R.; Lobanova, K.; Abdulmyanova, L.; Rasulova, G. (2013). Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations. *Int. J. Eng. Sci. Technol*. 5: 19–24.

39. Hajjaj H., Niederberger P., Duboc P. (2001). Lovastatin biosynthesis by Aspergillus terreus in a chemically defined medium. Appl Environ Microbiol. 67, 2596–602.

40. Hancock, Nicole (2016). Ultrafiltration, Nanofiltration and Reverse Osmosis. Safe Drinking Water Foundation: веб-сайт: URL: https://www.safewater.org/fact-sheets-1/2017/1/23/ (дата звернення 01.12.2023)

41. Hassan A, Saleem Y, Chaudhry MN, Asghar A, Saleem M, Nawaz S, Syed Q, Iqbal MS, Shahzad K. (2019). Optimization of process variables for increased production of lovastatin in *Aspergillus terreus* PU-PCSIR1 and its characterization. *Pak J Pharm Sci*. 32(1), 363-370. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30829216/

42. Herrick JB. Landmark article (JAMA 1912). Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. By James B. Herrick. JAMA. 1983, 250:1757–65.

43. Hindler, K.; Cleeland, C.S.; Rivera, E.; Collard, C.D. (2006). The role of statins in cancer therapy. *Oncologist.,* 11(3), 306-315. http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.11-3-306

44. Hoyos P., Pace V., Alcántara A. R. (2019). Biocatalyzed synthesis of statins: A sustainable strategy for the preparation of valuable drugs. *Catalysts*, 9(3), 260. https://doi.org/10.3390/catal9030260

45. Hu N, Lin J, Gao J, Lin S, Duan S (2022). Lovastatin inhibits the proliferation of human cervical cancer hela cells through the regulation of tp53 pathway by mir-92a-1-5p. *Pak J Pharm Sci*. 35(6):1557-1564.

46. Huang X., Liang Y., Yang Y., Lu X. (2017). Single-step production of the simvastatin precursor monacolin J by engineering of an industrial strain of *Aspergillus terreus*. *Metab. Eng.*, 42, 109-114. http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.005

47. Huang J., Liao N., Li H. (2018). Linoleic acid enhance the production of moncolin K and red pigments in *Monascus ruber* by activating mokH and mokA, and by accelerating cAMP-PkA pathway. *Int. J. Biol. Macromol.*, 109, 950-954. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.074

48. Hubert, S., Chadwick, A., Wacher, V., Coughlin, O., Kokai-Kun, J., & Bristol, A. (2018). Development of a Modified-Release Formulation of Lovastatin Targeted to Intestinal Methanogens Implicated in Irritable Bowel Syndrome With Constipation. *Journal of pharmaceutical sciences*, *107*(2), 662–671. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.09.028

49. Hwang, K.-J., & Chou, Y.-C. (2008). Mechanism of centrifugal filtration for separation of microbe/protein bio-suspension. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.* 47(9-10), 1647–1655. doi:10.1016/j.cep.2007.09.007

50. Janani Balraj, Thandeeswaran Murugesan, Vidhya Kalieswaran. (2021). Lovastatin Production from *Cunninghamella blakesleeana* under Solid State Fermentation. *J Research Square*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-455135/v1

51. Javed S., Bukhari S.A., Zovia I., Meraj M. (2014). Screening of indigenously isolated fungi for lovastatin production and its in vivo evaluation. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 15(4), 422-427. http://dx.doi.org/10.2174/1389201015666140528152138

52. Kaminska M., Aliko A., Hellvard A., Bielecka E., Binder V., Marczyk A., …… Mydel P. (2018). Effects of statins on multispecies oral biofilm identify simvastatin as a drug candidate targeting *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontol.* 90(6), 637–646. https://doi.org/10.1002/JPER.18-0179

53. Katayama T., Tanaka Y., Okabe T., Nakamura H., Fujii W., Kitamoto K., Maruyama J. (2016). Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett*., 38(4), 637-642. http://dx.doi.org/10.1007/s10529-015-2015-x

54. Katsifas EA, Giannoutsou E, Lambraki M, Barla M, Karagouni AD (2004) *J Ind Microbiol Biotechnol*. 31:57–62

55. Kavalipati N., Shah J., Ramakrishan A., Vasnawala H. (2015). Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab*., 19(5), 554-62. DOI: 10.4103/2230-8210.163106.

56. Khongkliang P, Kongjan P, Utarapichat B, Reungsang A, Sompong O. (2017). Continuous hydrogen production from cassava starch processing wastewater by two-stage thermophilic dark fermentation and microbial electrolysis. *Int J Hydrog Energy*. 42, 27584–92. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.145

57. Koroglu EO, Yoruklu HC, Demir A, Ozkaya B. (2019). Scale-up and commercialization issues of the MFCs: challenges and implications. *Microbial electrochemical technology*. 565–83. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00023-6

58. Lam Y.S., Okello E.J. (2015). Determination of lovastatin, β-glucan, total polyphenols, and antioxidant activity in raw and processed oyster culinary-medicinal mushroom, Pleurotus ostreatus (Higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, 17(2), 117-128. http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i2.30

59. Lee S.S., Lee J.H., Lee I. (2013). Strain improvement by overexpression of the laeA gene in *Monascus pilosus* for the production of monascus-fermented rice. *J. Microbiol. Biotechnol*., 23(7), 959-965. http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1303.03026

60. Li N., Li M., Yu Z., Zhou J., Huang J. (2016). One-step fermentation for producing simvastatin via RNAi silencing of lovF gene in *Aspergillus terreus*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 32(4), 478-486. DOI: 10.13345/j.cjb.150344

61. Liao J.K., Laufs U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*., 45, 89–118. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748

62. Liguo Xie, Guodong Zhu, Junjie Shang, Xuemei Chen, Chunting Zhang, Xiuling Ji, Qi Zhang, Yunlin Wei (2021). An overview on the biological activity and anti-cancer mechanism of lovastatin, *Cellular Signalling,* 87:110-122. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110122.

63. Lin, C.L.; Tang, Y.L.; Lin, S.M. (2011). Efficient bioconversion of compactin to pravastatin by the quinoline-degrading microorganism *Pseudonocardia carboxydivorans* isolated from petroleumcontaminated soil. *Bioresour. Technol*., 102(22), 10187- 10193. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.029

64. Lisec, B.; Radež, I.; Žilnik, L.F. (2012). Solvent extraction of lovastatin from a fermentation broth. *Sep. Purif. Technol. 96*, 187–193. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.006

65. Liu S, Yang P, Wang M, Zhang S, Wang J, Pan T, Zhou P (2022). Inhibitory effect of lovastatin on human lung cancer cell proliferation by regulating the ERK1/2 and COX-2 pathways. *Transl Cancer Res*. 11(4):813-822. doi: 10.21037/tcr-22-346.

66. Liu, K., & ODonovan, J. F. (2023). Pharmacy Packaging and Inserts. *StatPearls*. StatPearls Publishing.

67. Mahin Basha Syed, M. Rajasimman (2015). Fermentative production and optimization of mevastatin in submerged fermentation using *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Reports*. 6, 124-128. https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.002.

68. Malay, L. N. (2014). Statins in the treatment and prevention of cardiovascular diseases: repetition of the past and optimism for the future. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology,* 10(5), 513–524. https://doi.org/10.20996/1819-6446-2014-10-5- 513-524

69. Malfitano, A.M.; Marasco, G.; Proto, M.C.; Laezza, C.; Gazzerro, P.; Bifulco, M. (2014). Statins in neurological disorders: An overview and update. *Pharmacol. Res*., 88, 74–83. doi: 10.1016/j.phrs.2014.06.007.

70. Manu, P., & Rogozea, L. (2016). The Discovery of Statins. *American Journal of Therapeutics,* 23(4), 980–981. doi:10.1097/mjt.0000000000000467.

71. Manzoni, M.; Bergomi, S.; Rollini, M.; Cavazzoni, V. (1999). Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol. Lett*., 21(3), 253- 257. http://dx.doi.org/10.1023/A:1005495714248

72. Manzoni, M.; Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 58(5), 555-564. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-0932-9

73. Mayengbam, S.S.; Singh, A.; Pillai, A.D.; Bhat, M.K. Influence of cholesterol on cancer progression and therapy (2021). *Transl. Oncol*., 14, 101043. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101043

74. McKenney JM. (2003). Pharmacologic characteristics of statins. *Clin Cardiol. Apr*., 26 (4 Suppl 3): III32-8. doi: 10.1002/clc.4960261507.

75. McLean, K.J.; Hans, M.; Meijrink, B.; van Scheppingen, W.B.; Vollebregt, A.; Tee, K.L.; van der Laan, J.M.; Leys, D.; Munro, A.W.; van den Berg, M.A. (2015). Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of Penicillium chrysogenum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(9), 2847-2852. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1419028112

76. McTaggart, F., Buckett, L., Davidson, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., ... & Warwick, M. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor (2001). *The American journal of cardiology*, 87(5), 28-32. https://doi.org/10.1016/S0002-9149(01)01454-0

77. Mihos, C.G.; Salas, M.J.; Santana, O. (2010). The pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in cardiovascular disease a

comprehensive review *Cardiol. Rev.*, 18, 298–304. DOI: 10.1097/CRD.0b013e3181f52a7f.

78. Mihos, C.G.; Artola, R.T.; Santana, O. The pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in rheumatologic disorders: A comprehensive review (2012). *Rheumatol. Int.*, 32, 287–294. https://doi.org/10.1007/s00296-011-2008-6

79. Miranda, R.U.; Gómez-Quiroz, L.E.; Mendoza, M.; Pérez-Sánchez, A.; Fierro, F.; Barrios-González, J. (2014). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in Aspergillus terreus during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biol.*, 118(12), 979-989. http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.002

80. Morofuji, Y., Nakagawa, S., Ujifuku, K., Fujimoto, T., Otsuka, K., Niwa, M., & Tsutsumi, K. (2021). Beyond Lipid-Lowering: Effects of Statins on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases and Cancer. *Pharmaceuticals, 15*. https://pdfs.semanticscholar.org/bfe9/6ecd6461da63034b0a872c82f98906e86886.pdf?_gl=1*176k5x9*_ga*MzA0OTEwODE2LjE2ODA1MTY2NDc.*_ga_H7P4ZT52H5*MTY4MDUxNjY0Ny4xLjEuMTY4MDUxNjc0NS4wLjAuMA..

81. Mouafi, F.E.; Abo Elsoud, M.M.; Moharam, M.E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnol. Rep. (Amst.),* 9, 31-37. http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003

82. Mukhtar, H.; Ijaz, S.S.; Ikram-ul-Haq. (2014). Upstream and downstream processing of lovastatin by *Aspergillus terreus*. *Cell Biochem. Biophys.*, 70(1), 309-320. http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-9914-7

83. Murakami R, Chen C, Lyu SY, Lin CE, Tzeng PC, Wang TF, Chang JC, Shieh YH, Chen IF, Huang SK, Lin HW (2016). Lovastatin lowers the risk of breast cancer: a population-based study using logistic regression with a random effects model. *Springerplus.* 5(1):1932. doi: 10.1186/s40064-016-3606-2.

84. Murphy C., Deplazes E., Cranfield C.G., Garcia A. The Role of Structure and Biophysical Properties in the Pleiotropic Effects of Statins (2020). *International Journal of Molecular Sciences*. 21(22):8745. https://doi.org/10.3390/ijms21228745

85. Naganandhini SK, Thangavelu K, Sekar A, Uthandi S. (2021). *Aspergillus caespitosus* ASEF14, oleaginous fungi as a potential candidate for biodiesel production using starch processing wastewater. *Microbial Cell Fact*. 20(1):1–23.

86. Neto RNM, de Barros Gomes E, Weba-Soares L, Dias LRL, da Silva LCN, de Miranda RCM. (2019). Biotechnological Production of Statins: Metabolic Aspects and Genetic Approaches. *Curr Pharm Biotechnol*. 20(15):1244-1259. doi: 10.2174/1389201020666190718165746.

87. Nicholas P. Money, Chapter 12 - Fungi and Biotechnology, Editor(s): Sarah C. Watkinson, Lynne Boddy, Nicholas P. Money, The Fungi (Third Edition), Academic Press, 2016, Pages 401-424, ISBN 9780123820341. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00012-8.

88. Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., Wiklund, O., Hegele, R. A., Raal, F. J., Defesche, J. C., Wiegman, A., Santos, R. D., Watts, G. F., Parhofer, K. G., Hovingh, G. K., Kovanen, P. T., Boileau, C., Averna, M., Boren, J., ... Tybjaerg-Hansen, A. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, *34*(45), 3478–3490. https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht273

89. Oesterle, A.; Laufs, U.; Liao, J.K. (2017). Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circ. Res*. 120, 229–243. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.308537

90. O'Malley PG, Arnold MJ, Kelley C, Spacek L, Buelt A, Natarajan S, Donahue MP, Vagichev E, Ballard-Hernandez J, Logan A, Thomas L, Ritter J, Neubauer BE, Downs JR (2020). Management of Dyslipidemia for Cardiovascular Disease Risk Reduction: Synopsis of the 2020 Updated U.S. Department of Veterans Affairs and U.S. Department of Defense Clinical Practice Guideline. *Ann Intern Med*., 173(10), 822-829. https://doi.org/10.7326/M20-4648

91. Parihar, S.P.; Guler, R.; Brombacher, F. (2018). Statins: A viable candidate for host-directed therapy against infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol*., *19*(2), 104–117. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0094-3

92. Prabhakar M, Lingappa K, Vivek B, Amena S, Vishalakshi N, Mahesh D. (2011). Characterization of physical factors for optimum lovastatin production by Aspergillus terreus KLVB28mu21 under solid state fermentation. *J Recent Adv Appl*. 27: 1-5.

93. Pattanagul, P.; Pinthong, R.; Phianmongkhol, A.; Tharatha, S. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus sp. Int. J. Food Microbiol.*, 126(1-2), 20-23. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.019

94. Pinal-Fernandez I., Casal-Dominguez M., Mammen AL (2018). Statins: pros and cons. *Med Clin (Barc)*., 150(10), 398-402. https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.11.030

95. Radha, K.V., Lakshmanan, D. (2013). A review: Lovastatin production and applications. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*., 6, 21-26.

96. Rahim, M.H.A.; Harith, H.H.; Montoya, A.; Abbas, A. (2017). Growth and lovastatin production by *Aspergillus terreus* under different carbohyrates as carbon sources. *Biocatal. Agric. Biotechnol*. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.011

97. Ray KK, Cannon CP. (2005). The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 46(8), 1425-33. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.05.086

98. Reddy, J.M.; Raut, N.G.R.; Seifert, J.L.; Hynds, D.L. (2020). Regulation of small GTPase prenylation in the nervous system. *Mol. Neurobiol*. 57, 2220–2231. https://doi.org/10.1007/s12035-020-01870-0

99. Reis, P.A.; Alexandre, P.C.B.; D'Avila, J.C.; Siqueira, L.D.; Antunes, B.; Estato, V.; Tibiriça, E.V.; Verdonk, F.; Sharshar, T.; Chrétien, F.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Bozza, F.A. (2017). Statins prevent cognitive impairment after sepsis by

reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction. *Brain Behav. Immun.*, 60, 293-303. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.006

100. Ribeiro, N.Q.; Costa, M.C.; Magalhães, T.F.F.; Carneiro, H.C.S.; Oliveira, L.V.; Fontes, A.C.L. … Santos, D.A. (2017). Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 49(6), 695-702. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.005

101. Sangeetha V, Sivakumar V. (2016). Biogas production from synthetic sago wastewater by anaerobic digestion: optimization and treatment. *Chem Ind Chem Eng Q*. 22, 33–9.

102. Sayyad, S.A.; Panda, B.P.; Javed, S.; Ali, M. (2007). Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(5), 1054-1058. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0577-1

103. Schachter M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*., 19(1), 117-25. https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x

104. Seenivasan A., Subhagar S., Rajendran A., Thangavelu V. (2008). Microbial Production and Biomedical Applications of Lovastatin. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 70, 701-9. doi:10.4103/0250-474X.49087.

105. Seydametova, E. (2013). Production of pravastatin by filamentous fungi isolated from soil. http://umpir.ump.edu.my/id/eprint/7293/1/CD7797.pdf

106. Seydametova, E. (2015). Novel pravastatin-producing *Penicillium janthinellum* strain isolated from soil. Int. *J. Biosci. Biochem. Bioinform*., 5(2), 80. http://dx.doi.org/10.17706/ijbbb.2015.5.2.80-90

107. Sirtori, C.R. (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacol. Res.* 88, 3–11. DOI: 10.1016/j.phrs.2014.03.002

108. Siegel AB (2013). Use of statins in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 9(8):512-4.

109. Simone, E., Zhang, W., & Nagy, Z. K. (2015). Analysis of the crystallization process of a biopharmaceutical compound in the presence of

impurities using process analytical technology (PAT) tools. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 91(5), 1461–1470.*

110. Sivakumar U, Kiruthika T, Naganandhini S. (2019). Decontamination and simultaneous lipid production from sago processing wastewater by oleaginous yeast strain and uses thereof, 201941020275. Indian patent.

111. Sparks, D.L. (2011). Alzheimer disease: statins in the treatment of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol*., 7(12), 662-663. http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2011.165

112. Srinivasan, N., Thangavelu, K. & Uthandi, S. (2022). Lovastatin production by an oleaginous fungus, *Aspergillus terreus* KPR12 using sago processing wastewater (SWW). *Microb Cell Fact* **21**, 22. https://doi.org/10.1186/s12934-022-01751-2

113. Subhan, M.; Faryal, R.; Macreadie, I. (2016). Exploitation of *Aspergillus terreus* for the Production of Natural Statins. *J. Fungi*. 2, 13. https://doi.org/10.3390/jof2020013

114. Suraya, N.; Owolabi, F.; Khalil, H.A.; Saurabh, C.K.; Paridah, M.; Asniza, M.; Samsul, R. (2018). Synergistic effect of oil palm based pozzolanic materials/oil palm waste on polyester hybrid composite. *J. Polym. Environ*., 26(10), 4063-4072. http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1278-4

115. Syed, M.B.; Rajasimman, M. (2015). Fermentative production and optimization of mevastatin in submerged fermentation using *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Rep. (Amst.)*, 6, 124-128. http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.002

116. Syed, M.B.; Ponnusamy, T. (2017). Bioconversion of mevastatin to pravastatin by various microorganisms and its application - A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 13, 62-74. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.002

117. Syed, M.B.; Ponnusamy, T. (2018). Bioconversion of mevastatin to pravastatin by various microorganisms and its applications-A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol*., 13, 62-74. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.002

118. Talan, D.A.; Krishnadasan, A.; Gorwitz, R.J.; Fosheim, G.E.; Limbago, B.; Albrecht, V.; Moran, G.J.; Group, E.M.I.N.S. (2011). Comparison of

Staphylococcus aureus from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clin. Infect. Dis*., 53(2), 144-149. http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir308

119. Thangavelu K, Sundararaju P, Srinivasan N, Muniraj I, Uthandi S. (2020). Simultaneous lipid production for biodiesel feedstock and decontamination of sago processing wastewater using *Candida tropicalis* ASY2. *Biotechnol Biofuels.,* 13(35), 1–14. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01676-1

120. Thangavelu K, Sundararaju P, Srinivasan N, Uthandi S. (2021). Characterization of biomass produced by *Candida tropicalis* ASY2 grown using sago processing wastewater for bioenergy applications and its fuel properties. *Biomass Convers Biorefin*. 1–14. https://doi.org/10.1007/s13399-020-01129-7

121. Upendra, R.; Khandelwal, P.; Amiri, Z.; Shwetha, L.; Ausim, M. (2013). Screening and molecular characterization of natural fungal isolates producing lovastatin. *Microb. Biochem. Technol. 5*, 25–30.

122. van Reis, R., & Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, *12*(2), 208–211. https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00201-9.

123. Weng, T.C.; Yang, Y.H.; Lin, S.J.; Tai, S.H. (2010). A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *J. Clin. Pharm. Ther*., 35(2), 139-151. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2710.2009.01085.x

124. Wiewel, M.A.; Scicluna, B.P.; van Vught, L.A.; Hoogendijk, A.J.; Zwinderman, A.H.; Lutter, R.; Horn, J.; Cremer, O.L.; Bonten, M.J.; Schultz, M.J.; van der Poll, T. (2018). The host response in critically ill sepsis patients on statin therapy: A prospective observational study. *Ann. Intensive Care*, 8(1), 9. http://dx.doi.org/10.1186/s13613-017-0349-3

125. Xiao Y, Liu Q, Peng N, Li Y, Qiu D, Yang T, Kang R, Usmani A, Amadasu E, Borlongan CV, Yu G (2022). Lovastatin Inhibits RhoA to Suppress Canonical Wnt/β-Catenin Signaling and Alternative Wnt-YAP/TAZ Signaling in Colon Cancer. *Cell Transplant*. 31:9636897221075749. doi: 10.1177/09636897221075749.

126. Yamamoto A, Sudo H, Endo A. (1980). Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*., 35, 259–266.

127. Yanuck, D.; Mihos, C.G.; Santana, O. (2012). Mechanisms and clinical evidence of the pleiotropic effects of the Hydroxy-Methyl-Glutaryl-CoA Reductase inhibitors in Central Nervous System disorders: A comprehensive review. *Int. J. Neurosci*., 122, 619–629. https://doi.org/10.3109/00207454.2012.704455

128. Zeina A., Ibrahim M. F., Abdulla A. A., Marwan M. M. (2020). Pharmacological Aspects of Statins Are Relevant to Their Structural and Physicochemical Properties. *SRP*., 11(7), 167-17. https://www.sysrevpharm.org/articles/pharmacological-aspects-of-statins-are-relevant-to-their-structural-and-physicochemical-properties.pdf

129. Zhang, B.B.; Xing, H.B.; Jiang, B.J.; Chen, L.; Xu, G.R.; Jiang, Y.; Zhang, D.Y. (2018). Using millet as substrate for efficient production of monacolin K by solid-state fermentation of Monascus ruber. *J. Biosci. Bioeng*., 125(3), 333-338. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.011

130. Zong, H., Zhuge, B., Fang, H. *et al.* (2013). Advances in the bioconversion mechanism of lovastatin to wuxistatin by *Amycolatopsis* sp. CGMCC 1149. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 599–609 . https://doi.org/10.1007/s00253-012-4341-4

131. Zuhra K, Szabo C. (2021). The two faces of cyanide: an environmental toxin and a potential novel mammalian gasotransmitter. *FEBS J*.1–35

MultiCraft

International Journal of Engineering, Science and Technology
Vol. 5, No. 3, 2013, pp. 19-24

INTERNATIONAL JOURNAL OF ENGINEERING, SCIENCE AND TECHNOLOGY

www.ijest-ng.com
www.ajol.info/index.php/ijest
© 2013 MultiCraft Limited. All rights reserved

Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations

T.G. Gulyamova, D.M. Ruzieva, S.M. Nasmetova, R.S. Sattarova*, K.V. Lobanova, L.A. Abdulmyanova, G.A. Rasulova

Department of Biochemistry of Physiologically Active Compounds, Institute of Microbiology of the Academy of Sciences RU, UZBEKISTAN
**Corresponding Author: e-mail: regina.s.sattarova@gmail.com, Tel. +998-90-1898179, Fax +998-71-2442582*

Abstract

Lovastatin production by *Aspergillus terreus* indigenous strains in submerged (SmF) and solid state fermentations (SSF) have been studied. To evaluate the ability to produce lovastatin various cultivation media and substrates have been used. The obtained data showed good lovastatin yield by *A. terreus 4* and *A. terreus 20* both in SmF and SSF. At submerged cultivation of *A. terreus 4* and *A. terreus 20* on five different glucose and lactose based media the highest titer of lovastatin has been obtained on lactose based media, namely 276 mg/l and 236 mg/l, respectively. Five various types of bran have been tested as solid substrates for production of lovastatin in SSF - wheat bran, oat bran, maize bran, rice bran and mix of wheat and peanut bran. It has been observed that fermentation of *A. terreus 4* on wheat and *A. terreus 20* on oat bran causes the highest lovastatin yield - 9.7 and 9.56 mg/g, respectively.

Keywords: lovastatin, submerged fermentation, solid state fermentation, production

DOI: http://dx.doi.org/10.4314/ijest.v5i3.2

1. Introduction

Lovastatin is a fungal secondary metabolite used for lowering blood cholesterol. It acts as an effective inhibitor of the enzyme hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (mevalonate: NADP1 oxydoreductase, EC 1.1.1.34) that catalyzes the reduction of HMG-CoA to mevalonate during synthesis of cholesterol (Alberts *et al.*, 1980). It has been shown that lovastatin very competitively inhibits the reductase which decrease serum cholesterol levels by blocking cholesterol biosynthesis.

Lovastatin has a polyketide structure and is produced as a secondary metabolite by a variety of filamentous fungi such as *Monascus (M. ruber, M. purpureus, M. pilosus, M. anka), Penicillium (P. citrinum), Paecilomyces viridis,* and *Aspergillus (A.*

2.3 Solid state fermentation: Substrates such as wheat bran, oat bran, rice bran, maize bran and mix of wheat and peanut bran were used in the solid state fermentation process. Before fermentation, substrates were ground to the size of 20 mesh. SSF was performed in 500 ml conical flasks, containing 50 g of solid substrate. The flasks were autoclaved for 40 min at 121°C, the substrate's moisture content was measured and adjusted to a level 55-65% with nutrient solution (%): glucose – 11, glycerol -16, $MgSO_4$ – 0,75, $(NH_4)_2HSO_4$ – 2,3, KH_2PO_4 – 2, maltose - 5, pH -7,5. After moistening of substrate, 2,5 ml of inoculum (with spore concentration of 10^7-10^8 ml^{-1}) was added. The flasks were shaken evenly and incubated at 28°C for 14 days. At the end of incubation SSF substrate was dried at 100-105°C, ground using a porcelaine pestle and mortar to a fine powder and used to estimate the lovastatin content by HPLC analysis (Morovjan *et al.*, 1997).

2.4 Lovastatin extraction: After SmF, lovastatin was extracted from biomass after centrifugation of the whole culture suspension at 6000 rpm for 20 min. 1g of mycelium was washed using 0,05M HCL and extracted with 20 ml of acetonitrile on rotary shaker for 60 min at 160 rpm. Extracts were dried with Na_2SO_4, concentrated to 2 ml by vacuum evaporation and used for lovastatin estimation. After SSF, lovastatin was extracted from 1g of ground substrate using 20 ml of acetonitrile by shaking on a rotary shaker for 60 min at 160 rpm, centrifuged for 10 min at 6000 rpm, and then the supernatant was used for HPLC analysis.

2.5 HPLC analysis of lovastatin: Prepared extract samples, obtained both by SmF and SSF were quantitatively analyzed for the presence of lovastatin. HPLC analysis was carried out in a reverse phase Zorbax Eclipse XDB C-18 (150x4,6 мм i.d., 5 µm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (60 : 40 by volume) containing 0,1 % phosphoric acid. The sample injection volume was 20 µl, the eluent flow rate 1,5 ml/min and the detection wavelength 238 nm. The identity of the compound was confirmed with a commercial sample of lovastatin (Gedeon Richter) as standart (Manzoni *et al.*, 1998).

As shown in Figure1, biosynthesis of lovastatin in both strains reaches its maximum by the 11th day of growth on oat and wheat bran. The same dynamic of lovastatin accumulation we have observed at SSF on all used substrates.

Table 2. Effect of different solid substrates on lovastatin yield by *Aspergillus terreus* strains

Strains	**Solid substrate**	**Lovastatin titer** (mg/g)
A.terreus 20	Rice	2,67
	Wheat	5,54
	Oat	9,56
	Wheat + peanut (1:1)	0,4
	Maize	3,2
A.terreus 4	Rice	4,2
	Wheat	9,7
	Oat	8,4
	Wheat + peanut (1:1)	4,8
	Maize	4,4

The summary results presented in Table 2 show that when using oat and wheat brans as substrates both *A. terreus* strains had nearly similar productivity which was higher than for the rest of the substrates. The yields of lovastatin in extracts of *A. terreus 4* and *A. terreus 20* after SSF are comparable with ones previously reported for *Monascus ruber* (Xu *et al.*, 2005), *A. flavipes* BICC 5174 (Valera *et al.*, 2005), and was significantly higher than for *A. terreus* 20524 (Wei *et al.*, 2007; Jaivel *et al.*, 2010).

Comparison of data for submerged and solid-state fermentation methods for lovastatin production by *A. terreus 4* and by *A. terreus 20* have demonstated a clear advantage for SSF with productivity increase on solid substrates by more than 30 times (9.7 и 9.56 mg/g against 0.276 and 0.236 mg/ml, respectively).

4. Conclusions

The ability of two indigenous strains of *A. terreus* to produce lovastatin in SmF and SSF have been studied. In SmF, lovastatin yield was elevated on lactose based media and reached its maximum - 276 mg/l and 236 mg/l by *A. terreus 4* and *A. terreus 20*, respectively. In SSF with various substrates used – wheat bran, oat bran, maize bran, rice bran and mixed wheat and peanut bran - the preferred substrate was wheat and oat bran and maximum titers of lovastatin were 9.7 and 9.56 mg/g, for *A. terreus 4* and *A. terreus 20*, respectively.