

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

АЙСІНА Анастасія Володимирівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біологічно активні речовини морських мікроміцетів

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, доц., к.т.н.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 914-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Penicillium janthinellum*; цільовий продукт: пеніцилон

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Морські мікроміцети та речовини, які вони синтезують. Розділ 2. Використання біологічно-активних речовин у фармації. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва пеніцилону с для лікарського засобу проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу. Розділ 4. Обґрунтування післяферментаційних процесів. Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях. Розділ 6. Специфікація обладнання для одержання пеніцилону С. Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення пеніцилону С для одержання лікарського засобу проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу. Розділ 8. Контроль виробництва пеніцилону С для лікарського засобу проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу. Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу проти остеомієліту. Розділ 10. Матбаланс на серію лікарського засобу на основі пеніцилону С. Розділ 11. Специфікація обладнання для одержання ін'єкційного препарату. Розділ 12. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти остеомієліту. Розділ 13. Опис лікарського засобу на основі пеніцилону С згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна та апаратурна схеми виділення та очищення пеніцилону С – 2 та 1 аркушу листа формату А1; Технологічна та апаратурна схеми виробництва лікарського засобу на основі пеніцилону С – по 1 аркушу листа формату А1;

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Морські мікроміцети та речовини, які вони синезують.	01.11.2023-06.11.2023	
2	Розділ 2. Використання біологічно-активних речовин у фармації.	07.11.2023-12.11.2023	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва пеніцилону с для лікарського засобу проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу.	13.11.2023-18.11.2023	
4	Розділ 4. Обґрунтування післяферментаційних процесів.	19.11.2023-24.11.2023	
5	Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.	25.11.2023-30.11.2023	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання для одержання пеніцилону С.	01.12.2023-07.12.2023	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення пеніцилону С для одержання лікарського засобу проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу.	08.12.2023-14.12.2023	
8	Розділ 8. Контроль виробництва пеніцилону С для лікарського засобу проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу.	15.12.2023-21.12.2023	
9	Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу проти остеомієліту.	22.12.2023-28.12.2023	
10	Розділ 10. Матбаланс на серію лікарського засобу на основі пеніцилону С.	29.12.2023-01.01.2024	
11	Розділ 11. Специфікація обладнання для одержання ін'єкційного препарату.	02.01.2024-05.01.2024	
12	Розділ 12. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти остеомієліту.	05.01.2024-10.01.2024	
13	Розділ 13. Опис лікарського засобу на основі пеніцилону С згідно АНД	11.01.2024-13.01.2024	
14	Оформлення пояснювальної записки	14.01.2024-16.01.2024	
15	Оформлення графічної частини роботи	17.01.2024-20.01.2024	

Здобувач

_____ (підпис)

Анастасія АЙСІНА

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана робота присвячена розробці нового препарату, який має анатгоністичні властивості проти метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA). Як субстанцію було обрано пеніцилон С, який має мінімальну інгібуючу концентрацію до MRSA 6,25 мкг/мл.

За основу розробки було взято до уваги кількість випадків остеомієліту, яке в середньому становить 3,5 випадки на 10 000 населення. З врахуванням особливостей цього захворювання, запропоновано забезпечувати Дніпропетровську область. Розрахунок вівся за випадками остеомієліту, який вражає ноги (63%), а також, за кількістю, які викликають саме MRSA (17%). Тривалість лікування пеніцилоном С становить 5 тижнів, а добова доза – 48,8 мг. Запропоновано забезпечувати лише 1% від загальної потреби області, через наявність альтернативних антибіотичних препаратів, які потенційно можуть ще використовуватись для лікування цього захворювання. З врахуванням втрат, річна кількість культуральної рідини становила 32,4 м³.

Схема виділення та очищення пеніцилону передбачає лише високоефективну рідинну хроматографію, що не підходить для промислового виробництва. Тому, спираючись на основну технологію, було запропоновано альтернативу, шляхом постійної екстракції відповідних речовин. Останній етап екстракції передбачає наявність у розчині пеніцилону А та пеніцилону С, але оскільки термостійкість пеніцилону А є нижчою за пеніцилон С, а тому їх відокремлення відбувається звичайним кип'ятінням.

Під час виробництва контролюють жорсткість води, концентрацію метанолу, вагу, вологість та колір пеніцилону С, а також його антимікробну активність проти MRSA.

Робота містить вступ, 13 розділів та список літератури з 137 джерел. В роботі наведено 20 рисунків та 17 таблиць. Графічна частина містить апаратурну та технологічну схеми по 2 листа формату А1.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, MRSA, остеомієліт, екстракція, *Penicillium janthinellum* НК1-6, пеніцилон С.

ABSTRACT

This work is devoted to the development of a new drug that has antagonistic properties against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Penicillon C, which has a minimum inhibitory concentration for MRSA of 6.25 µg/ml, was chosen as a substance.

The number of cases of osteomyelitis, which averages 3.5 cases per 10,000 population, was taken into account as the basis of the development. Taking into account the peculiarities of this disease, it is proposed to provide the Dnipropetrovsk region. The calculation was based on cases of osteomyelitis affecting the legs (63%), as well as on the number of cases caused by MRSA (17%). The duration of treatment with penicillin C is 5 weeks, and the daily dose is 48.8 mg. It is proposed to provide only 1% of the total need of the region, due to the availability of alternative antibiotic drugs that can potentially still be used to treat this disease. Taking into account the losses, the annual amount of cultural fluid was 32.4 m³.

The scheme for isolation and purification of penicillin involves only high-performance liquid chromatography, which is not suitable for industrial production. Therefore, based on the basic technology, an alternative was proposed, through the constant extraction of the relevant substances. The last stage of extraction involves the presence of penicillin A and penicillin C in the solution, but since the heat resistance of penicillin A is lower than penicillin C, and therefore their separation takes place by ordinary boiling.

During production, water hardness, methanol concentration, weight, moisture content and color of penicillin C are monitored, as well as its antimicrobial activity against MRSA.

The work contains an introduction, 13 chapters and a bibliography of 137 sources. The work contains 20 figures and 17 tables. The graphic part contains hardware and technological diagrams on 2 sheets of A1 format.

Key words: antibiotic resistance, MRSA, osteomyelitis, extraction, *Penicillium janthinellum* HK1-6, penicillin C.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. МОРСЬКІ МІКРОМІЦЕТИ ТА РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВОНИ СИНТЕЗУЮТЬ	10
1.1. Морські мікроміцети та місця їх ізоляції.....	10
1.2. Біологічно-активні речовини, які синтезують морські мікроміцети.....	14
1.2.1. Антибіотики.....	14
1.2.2. Ферменти.....	20
1.2.3. Барвники.....	26
1.2.4. Інші речовини.....	29
РОЗДІЛ 2. ВИКОРИСТАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ФАРМАЦІЇ	34
2.1. Бактеріальні інфекції.....	34
2.2. Лікування ракових клітин.....	36
2.3. Використання біологічних речовин мікроміцетів для інших захворювань.....	38
ВИСНОВКИ	40
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ	41
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі пеніцилону С, галузей використання, потреби у лікарському засобі проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу.....	41
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	54
3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі пеніцилону С.....	54

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки пеніцилону С.....	58
3.3. Вибір біологічного агента.....	59
3.4. Розрахунок потреби у пеніцилоні С для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості пеніцилону С.....	64
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ.....	67
4.1. Обґрунтування методу відділення супернатанту від біомаси.....	69
4.2. Обґрунтування концентрування супернатанту.....	70
4.3. Обґрунтування розчинів для екстракції пеніцилону.....	70
4.4. Обґрунтування методу відокремлення пеніцилону С від пеніцилону А.....	72
4.5. Обґрунтування методу сушіння пеніцилону С.....	72
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	74
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПЕНІЦИЛОНУ С.....	78
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ.....	81
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ.....	85
8.1. Визначення жорсткості води знесоленої.....	85
8.2. Визначення концентрації метанолу.....	85

ВСТУП

Метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA) вважається історичним зоонозним патогеном, що має важливе значення для охорони здоров'я та ветеринарії. *S. aureus* викликає серйозні проблеми як у людей, так і у тварин і може протистояти несприятливим умовам навколишнього середовища, таким як сонячне світло та висихання. Бактерія може проникати в шкіру, слизові оболонки та внутрішні органи, викликаючи серйозні захворювання як у тварин, так і у людей, включаючи гнійні інфекції шкіри, акне, остеомієліт, ендокардит, інфекція дихальних шляхів і септицемія. Крім того, *S. aureus* є одним із основних збудників маститу великої рогатої худоби [1].

S. aureus є грампозитивним мікроорганізмом сферичної форми, нерухомим, не утворює спор, а деякі штами є капсульованими. Перше виділення здійснив Олександр Огстон під час дослідження бактерій септицемії та ранової інфекції в 1880 р. Мікроскопічне дослідження 88 зразків гною виявило наявність грампозитивних коків *S. aureus*. Більшість штамів визначається клінічним шляхом визначення гена *mecA* на основі полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), а також стійкості до цефокситину. Ген *mecA* головним чином кодує білок, що зв'язує пеніцилін (PBP-2A), який відповідає за цей тип антимікробної резистентності. MRSA є вірулентними зоонозними біоварами *S. aureus*, які демонструють специфічні критерії резистентності до цефокситину та метициліну. Різні фенотипові та молекулярні моделі можуть розрізняти метицилін-чутливий *S. aureus* (MSSA) і MRSA [1,2].

MRSA завжди демонструє мультирезистентність не лише до пеніциліну, але й до різних класів антимікробних препаратів, включаючи; макроліди, фторхінолони, аміноглікозиди, тетрацикліни та лінкозаміди. MRSA може викликати важкі інфекційні захворювання у людини, у тому числі; гнійний ендокардит, гнійна пневмонія, середній отит, остеомієліт, гнійні інфекції шкіри,

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Айсіна А.В.</i>				<i>ВСТУП</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>						7	118
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

м'яких тканин і септичний артрит. Поява мультирезистентних вірулентних штамів MRSA є надзвичайною проблемою для охорони здоров'я [1].

MRSA вперше був помічений серед клінічних ізолятів пацієнтів, госпіталізованих у 1960-х роках, але з 1990-х років він швидко поширився серед населення. Хоча інфекція MRSA поширена в усьому світі, єдиного пандемічного штаму не існує. Натомість MRSA має тенденцію виникати у хвилях інфекції, що часто характеризується серійною появою домінуючих штамів. Останні приклади нових штамів MRSA включають клоновий комплекс 30 (CC30) MRSA, пов'язаний із медичним обслуговуванням (HA-MRSA) у Північній Америці та Європі, MRSA, пов'язаний із суспільством (CA-MRSA) USA300 у Північній Америці, та MRSA, пов'язаний із тваринництвом (включаючи ST398) і ST93 в Австралії. Рівень як CA-MRSA, так і HA-MRSA, наразі в деяких регіонах іде на спад, ця тенденція вперше була помічена з HA-MRSA в Англії. Причина послідовного зростання та падіння певних типів штамів залишається погано вивченою [2].

Колонізація MRSA підвищує ризик інфікування, а інфікуючі штами збігаються з колонізуючими штамми в 50–80% випадків. Майже будь-який предмет, що контактує зі шкірою, може служити збудником передачі MRSA, від білих халатів і краваток до ручок і мобільних телефонів. Колонізація може тривати тривалий час. MRSA також може зберігатися в домашніх умовах, що ускладнює його лікування. У той же час колонізація не є статичною, оскільки було виявлено, що штами еволюціонують і навіть замінюються в межах одного господаря [2].

Навіть незважаючи на триваючу розробку нових антибіотиків, активне спостереження та прогрес у профілактиці інфекцій, MRSA залишається видатним збудником із постійно високою смертністю. Поява антибіотиків знизилася смертність від *S. aureus* бактеріємії з 80% до все ще неприйнятних 15–50%. Масштабні дослідження продовжують розширювати розуміння генетичної різноманітності, епідеміології, еволюції та лікування MRSA [2].

Проте, основними недоліками традиційних антибіотиків є побічна дія та стійкість до ліків. Стійкість до ліків потребує вищих доз антибіотиків, що часто викликає гнітючу токсичність. Ця обставина є замкнутим колом. Ванкоміцин, який використовується як засіб першого вибору, обмежений кількома

проблемами. Нефротоксичність, пов'язана з мінімумом і тривалістю, є найбільш очевидною проблемою щодо ванкоміцину. Повільна антибактеріальна швидкість, низьке проникнення в тканини та підвищена стійкість до ліків також похитують віру в ванкоміцин. VISA (ванкоміцин-проміжний *S. aureus*) з'явилася в Японії в 1997 році, а VRSA (ванкоміцин-резистентні *S. aureus*) вперше була знайдена в США в 2002 році. Незважаючи на те, що даптоміцин використовується при бактеріємії MRSA, його не можна застосовувати при пневмонії нижніх дихальних шляхів, і він може викликати рабдоміоліз та еозинофільну пневмонію. Ще однією проблемою щодо даптоміцину є несприйнятливість, що виникає під час лікування [3].

Комбіновані методи лікування не завжди є ефективними. На підставі досліджень *in vivo* на тваринній моделі ендокардиту та остеомієліту наявні дані не вказують на сприятливий ефект комбінованого застосування тетрацикліну та ванкоміцину при лікуванні інфекцій MRSA. Зіткнувшись із такою дилемою, використання нових антибіотиків вимагає значних економічних, трудових і тимчасових інвестицій під час розробки ліків і клінічних випробувань, що може бути не ідеальним вибором. У цьому випадку дуже важливо та важливо розробити нові стратегії боротьби з MRSA [3].

Було показано, що морські мікроорганізми виробляють сполуки, які пригнічують ріст стійкого до метициліну *S. aureus*. Серед цих бактерій мікроміцети є найбільш плідними продуцентами. Відомо, що мікроміцети морського походження виробляють сполуки унікальної структури з антимікробною активністю [4].

Тому, актуальністю теми є пошук нових антимікробних сполук, які можуть протистояти MRSA, як одного з методів лікування цього збудника, який поширений по всьому світу.

Новизною роботи є використання пеніцилону С, який було виділено з морського мікроміцету *Penicillium janthinellum* НК1-6, який синтезує 0,88 мг/л даної речовини, яка має мінімальну інгібуючу концентрацію до MRSA в 6,25 мкг/мл [5].

РОЗДІЛ 1

МОРСЬКІ МІКРОМІЦЕТИ ТА РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВОНИ СИНЕЗУЮТЬ

1.1. Морські мікроміцети та місця їх ізоляції

Незважаючи на екстремальні умови навколишнього середовища, які характеризуються відсутністю світла, мінімальною концентрацією кисню, температурою близько 2 °С і високим гідростатичним тиском, нещодавні дослідження виявили несподіване різноманіття грибів у зразках осади з морських глибин. Окрім відомих усюдисущих видів, ці джерела розкрили існування нових філотипів грибів, таких як так звана глибоководна група грибів. Імовірно нові групи грибів також були виявлені у зразках метаногідратоносних відкладень у Південно-Китайському морі та зонах мінімуму кисню в Аравійському морі. Крім того, значне різноманіття грибів стало результатом незвичайної екосистеми глибоководних гідротермальних джерел, знову ж таки з доказами передбачуваних нових таксономічних груп [6].

Помітна кількість нових філотипів (33%) також призвела до більш конкретного дослідження дріжджів із гідротермальних полів Серединно-Атлантичного хребта. Загалом, підтверджено, що дріжджі є домінуючим грибковим компонентом у морських глибинах у кількох океанічних місцях. Звіти про глибоководні гриби, здається, підтверджують, що ці види, можливо, зазнали певних фізіологічних адаптацій до екстремальних умов цього конкретного середовища. Це випадок штаму *Aspergillus terreus*, конідії якого були здатні проростати під високим тиском (200 бар), на відміну від інших штамів того ж виду наземного походження. Крім того, гіфи, віднесені до цього виду, були безпосередньо виявлені в осадах за допомогою імунофлуоресцентного фарбування. Дослідження кернів глибоководних відкладень також дозволило культивувати гриби з минулого в різних екологічних умовах. Наприклад, гриби,

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Айсіна А.В.</i>				РОЗДІЛ 1 МОРСЬКІ МІКРОМІЦЕТИ ТА РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВОНИ СИНЕЗУЮТЬ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>						10	118
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

які, ймовірно, були поховані протягом майже 420 000 років приблизно на 365 см нижче морського дна на глибині 5000 м у центральній частині Індійського океану тепер можуть рости в промислових умовах [6].

Морські середовища існування можна в цілому класифікувати на прибережні та глибоководні регіони, і про молекулярне різноманіття грибів повідомляється з обох цих регіонів. Проте досліджень у прибережних регіонах дуже мало порівняно з дослідженнями в глибоководних регіонах. Кожне з цих основних морських середовищ існування містить низку унікальних самодостатніх ніш, таких як кораловий риф, мангрові ліси та системи гідротермальних джерел. Дві з цих ніш, гідротермальний джерело та бідні киснем середовища існування були широко вивчені. В табл.1.1. наведено деякі мікроміцети та місця їх виділення за областями ізоляції [7].

Більшість видів мікрогрибів, які зареєстровані на сьогоднішній день, належать до підцарства *Dikarya* (92%). З них, 92 725 видів наразі прийнято в межах *Ascomycota* та 50 385 у *Basidiomycota*, що робить ці типи двома найбільшими в царстві грибів. Тобто, 63,6% мікроміцетів, про які повідомляється, відповідають *Ascomycota*, тоді як 28,5% представляють *Basidiomycota*, пропорція досить схожа на глобальне багатство двох типів. Серед *Pezizomycotina* (*Ascomycota*) найрізноманітнішими родами мікроміцетів є *Penicillium* (68 зареєстрованих видів) і *Trichoderma* (62 зареєстровані види). Рис.1.1. демонструє приблизний розподіл зареєстрованих мікроміцетів [8].

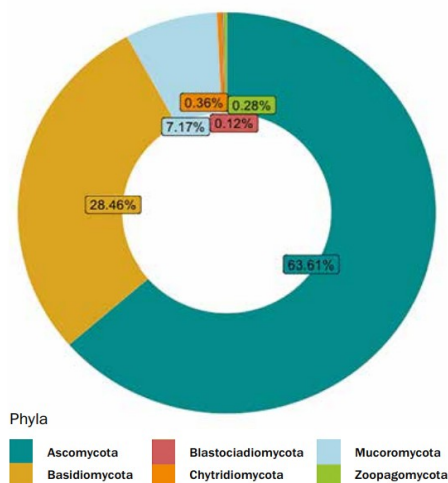


Рис.1.1. Приблизний розподіл мікроміцетів за відомими типами [8]

Місця виділення морських мікроміцетів [7]

Група виділення	Локація виділення	Визначені екологічні кластери
Прибережні регіони	Бокас-дель-Торо, Панама	<i>Ascomycota</i> : нові форми <i>Basidiomycota</i> та <i>Chytridiomycota</i>
	Морські губки з Гавайських островів (1–3 м)	<i>Ascomycota</i> : клади морських грибів, група клонів <i>Pezizomycotina</i> <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів.
	Біля Гаваїв (5–200 м)	<i>Ascomycota</i> та <i>Basidiomycota</i> : нові екологічні та морські грибні клади
	Біля Бразилії (0,5–50 м)	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> , <i>Chytridiomycota</i> та базальні лінії грибів
	Затока Сент-Вінсент (мангрові відкладення)	<i>Ascomycota</i> та <i>Basidiomycota</i>
Глибоководні регіони	Прохід Дрейка Антарктичного полярного фронту (250–3000 м)	<i>Ascomycota</i> , група клонів <i>Pezizomycotina</i>
	Південно-Китайське море (350–3011 м)	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів
	Одинадцять різних глибоководних регіонів (250–4000 м)	<i>Ascomycota</i> : глибоководний грибок група-I <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i> , базальна група клонів, нові екологічні клади
	Біля Японських островів (1200–10000 м)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> , глибоководний грибок група-I <i>Basidiomycota</i> , <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i>
	Сагамі Бей (1080 м)	<i>Ascomycota</i> : базальна група клонів, глибоководний грибок група-I, <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i> , базальна група клонів
	Центрально-Індійська западина (~5000 м)	<i>Ascomycota</i> та <i>Basidiomycota</i>
	Мексиканська затока (2400 м)	<i>Ascomycota</i> : глибоководний грибок група-I

Області гідротермальних джерел	Вентполе Гуаймас	<i>Ascomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів, <i>Basidiomycota</i>
	Гідротермальний район Серединно-Атлантичного хребта (2264 м)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів
	Гідротермальне джерело Лост-Сіті (750–900 м)	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів
	Система Серединно-Атлантичного хребта (860–2630 м)	<i>Ascomycota</i> : нові кластери <i>Basidiomycota</i> : нові кластери, гідротермальна та/або анаеробна група грибів, <i>Chytridiomycota</i> : нові кластери
	Окраїна та жолоб Перу (252–5086 м)	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів
Середовища, збіднені киснем	Аквапарк Берклі та приливна рівнина Болінас (прибережний безкисневий осад)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів, <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i>
	Солончакове болото Sippewisset (1,5 м)	<i>Ascomycota</i> , базальна група клонів
	Улоговина Каріако (270–900 м)	<i>Ascomycota</i>
	Затока Кагошима (204 м)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> , <i>Chytridiomycota</i> : базальна група клонів, <i>Cryptomycota</i>
	Улоговина Каріако (340 м)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> <i>Chytridiomycota</i> : нові екологічні ніші
	Острів Камікошікі	<i>Ascomycota</i> , <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i>
	Затока Сагамі (1174–1178 м)	<i>Ascomycota</i> : глибоководний грибок група-I <i>Basidiomycota</i> , <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i> , базальна група клонів
	Готландська глибина, Балтійське море (200–240 м)	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> , <i>Chytridiomycota</i> : <i>Cryptomycota</i>
	Басейн Аталанте (3501 м)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів

Середовища, збіднені киснем	Аравійське море (25–200 м)	<i>Ascomycota</i> : група клонів <i>Pezizomycotina</i> , <i>Basidiomycota</i> : гідротермальна та/або анаеробна група грибів, <i>Zygomycota</i> : нові кластери
-----------------------------	----------------------------	---

1.2. Біологічно-активні речовини, які синтезують морські мікроміцети

Розвиток біотехнології, яка базується на потенціалі мікроорганізмів в отриманні біологічно активних речовин (БАР), є одним із стратегічних напрямків сучасної світової науки. Місцезнаходження виду (штаму), в тому числі приналежних до регіону, які раніше були виділені виробникам; таксономічне положення виду (штаму), його культурально-морфологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярно-генетичні особливості. Ці особливості мікроскопічних грибів із екстремального середовища, які можуть допомогти їм виживати та розвиватися в умовах екстремальних факторів навколишнього середовища досліджуються для визначення механізмів адаптації мікробів до умов життя їх виробництва та БАР. Таким чином, серед мікроскопічних грибів на особливу увагу продуцентів БАР заслуговують ті, які можуть зберігати життєздатність і розвиватися в екстремальних умовах, оскільки вони є потужними джерелами потенційних метаболітів з антимікробною та протигрибковою активністю, які можуть бути об'єктом для фармацевтичної промисловості [9].

1.2.1. Антибіотики

Мікроорганізми морського походження відомі як продуценти багатьох структурно унікальних і сильних біологічно активних сполук, включаючи клінічні ліки та дослідницькі реагенти. Під час скринінгу нових метаболітів морських грибів *Aspergillus* sp. OPMF00272 було виявлено один новий сестертерпеноїд під назвою терретонін G, який виділяли з культурального бульйону разом із іншими відомими природними продуктами. Терретонін G продемонстрував антимікробну активність із інгібіторною зоною (10, 8 і 8 мм) проти грампозитивних бактерій

(*Staphylococcus aureus* FDA209P, *Bacillus subtilis* PCI219 і *Micrococcus luteus* ATCC9341), але не мав активності проти грамнегативних патогенів [10].

Нещодавно було виділено нові полікетидні антибіотики, ліндгоміцин і аскосетин. Ці речовини синтезувались ізолянтами різних штамів *Lindgomycetaceae*, які були виділені з губки Кільського фіорду в Балтійському морі (Німеччина) і з Антарктики. Ліндгоміцин і аскосетин показали антибіотичну активність зі значенням концентрації напівмаксимального інгібування (IC_{50}) 5,1 ($\pm 0,2$) мкМ і 3,2 ($\pm 0,4$) мкМ відповідно проти метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* [11].

З міцелію та культурального бульйону гриба *Engyodontium album* штаму LF069 виділено шість нових і два відомих полікетидних антибіотики з базовою структурою антрахінон-ксантону. Гриб було ізольовано з тканини губки *Cacospinga scalaris*, взятої в Лімському фіорді, Хорватія. Шість нових сполук отримали тривіальні назви енгіодонтохон А–F. Іншими речовинами було визначено як JBIR-97/98 та JBIR-99. Сполуки енгіодонтохону А та В, а також JBIR-97/98 та JBIR-99 виявляли інгібіторну активність проти метицилінрезистентного *S. aureus* (MRSA), яка була в 10 разів сильнішою, ніж хлорамфенікол. IC_{50} становили 0,17 ($\pm 0,02$), 0,24 ($\pm 0,04$), 0,19 ($\pm 0,02$) та 0,24 ($\pm 0,04$) мкМ відповідно [12].

В 2014 році було виділено 2 антибіотики на основі піридону, триходін А і триходін В, разом з відомою сполукою піридоксатином. Вони були вилучені з міцелію та культурального бульйону морського гриба *Trichoderma* sp. MF106, виділений з Гренландських морів. Триходін А і піридоксатин показали антибіотичну активність проти клінічно значущого мікроорганізму *S. epidermidis* зі значеннями IC_{50} 24 мкМ і 4 мкМ відповідно [13].

Песталон є видатним морським природним продуктом, який вперше виділив в результаті коферментації морського гриба *Pestalotia* sp. CNL-365 з морською бактерією *Thalassospira* sp. CNJ-328. Понад 10 років пестанол вважався новою багатообіцяючою антибіотичною сполукою, зареєстрована мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) проти MRSA становила 37 нг/мл. Після подолання

обмеженої доступності шляхом загального синтезу було встановлено, що активність песталону проти різних штамів MRSA становила 3-10 мкг/мл. Ряд синтетичних похідних пестанолу, включаючи песталахлорид А та інші ізоіндолінони (утворені в результаті реакції з амінами), не виявляли вищої активності порівняно з вихідною сполукою проти MRSA та низки рослинних патогенів [14].

Штам *Stachybotrys* sp. MF347 було виділено зі зразка коряги, зібраний у Гельголанді (Північне море, Німеччина). Було ідентифіковано 2 нових антибіотики на основі дріману в міцелії та культуральному бульйоні. Штам MF347 також продукував відомі спіроциклічні дрімани стахібоцин А і стахібоцин В, спіроциклічний дріман чартарлактан О, чартарлактан К, F1839А, стахіботрилактан, стахіботрамід, та ацетат 2 α -ацетоксистахіботрилактаму, а також іліциколін В, відомий сесквітерпен. Спіроциклічний дріман (стахіїн Б) виявив антибактеріальну активність проти клінічно значущого MRSA, яка становила IC₅₀ 1,75 (\pm 0,09) мкМ [15].

З морського гриба *A. candidus* KUFA було виділено антибіотик преуссин. Речовина виявляла інгібуючий ефект проти *S. aureus* ATCC 29213 і *Enterococcus faecalis* ATCC29212, а також проти MRSA і ванкоміцин-резистентних ентерококів (VRE). Також, преуссин зменшив значне утворення біоплівки в *E. coli* ATCC 25922. Крім того, преуссин виявив синергетичний ефект з оксациліном проти MRSA *S. aureus* 66/1 та з антибіотиком колістином проти *E. coli* 1410/1 [16].

Два нових полікетидних антибіотики, 6,8,5'6'-тетрагідрокси-3'-метилфлавоон і паецилін С, разом із шістьма відомими аналогами секалонової кислоти D, секалонової кислоти В, пеніциліксантону А, емодин, цитрерозеїн та ізородоптілометрин були отримані з бульйону асоційованого з горгонієвим коралом гриба *Penicillium* sp. SCSGAF 0023. 6,8,5'6'-Тетрагідрокси-3'-метилфлавоон мав значну активність проти осідання личинок *Balanus amphitrite* зі значенням напівмаксимальна ефективна концентрація (EC₅₀) мкг/мл відповідно, Результати показали, що асоційований з горгоновими коралами гриб *Penicillium* sp. Штам SCSGAF 0023 може виробляти протиобростаючі та антибактеріальні

сполуки. Пеніциліксантон А наприклад має високу антагоністичну активність проти *M. luteus*, *P. nigrifaciens*, *E. coli* та *B. subtilis* маючи MIC 24,4, 97,5, 24,4 та 24,4 мкг/мл відповідно [17].

Новий антибіотик, паецилін Е було виділено з екстракту культурального фільтрату гриба *Neosartorya fennelliae* KUFA 0811, пов'язаного з морською губкою. Паецилін Е був активним проти *S. aureus* ATCC 29213 і *E. faecalis* ATCC 29212. Сполука не пригнічує масове утворення біоплівки в жодному зі штамів (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212) у досліджуваних концентраціях і не виявляє синергічного зв'язку з антибіотиками [18].

З морського гриба *Penicillium* sp. Y-50-10, що живе в багатому сіркою осаді в гідротермальних джерелах Куейшантао біля Тайваню, виділено нове похідне веррукозидину метилізоверрукозидинол. Серед відомих досі сполук із веррукозидиновою основою, виділених із природних ресурсів, метилізоверрукозидинол являє собою перший приклад нового конформаційного ізомеру її скелета, що виявляє антибіотичну активність проти *B. subtilis* зі значенням MIC 32 мкг/мл. Однак значення MIC сполуки, отриманої проти *E. coli* та *S. aureus*, перевищували 64 мкг/мл і тому вважалися «незначною активністю». Тетрациклін використовувався як позитивний контроль проти *E. coli*, *S. aureus* і *B. subtilis*, які показали значення MIC 2, 2, 1 мкг/мл відповідно [19].

З екстракту ендофітного гриба *Stemphylium* sp. 33231 отримано два нових похідних α -пірону – інфектопірони А і В. Штам 33231 виділено з мангрових заростей *Brguiera sexangula* var. *rhynchopetala*, зібрані в Південно-Китайському морі. Сполуки мали широкий спектр антибактеріальної дії проти п'яти наземних патогенних бактерій, таких як *S. albus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *M. tetragenus* та *M. luteus*. Інфектопірон А мав значення MIC 5, 2,5 та 10 мкг/мл для *S. albus*, *E. coli* та інших штамів відповідно. Інфектопірон В продемонстрував трошки гірші значення. Для *E. coli* MIC становив 2,5 мкг/мл, для *S. albus*, *M. tetragenus* та *M. luteus* – 10 мкг/мл, а для *B. subtilis* це значення становило більше 20 мкг/мл. MIC ципрофлоксацину в середньому становив 0,3-0,6 мкг/мл щодо зазначених патогенів [20].

В табл.1.2. показано мікроміцети, що можуть синтезувати антибіотики.

Морські мікроміцети, які синтезують антибіотики та антибіотичні речовини

Мікроміцет	Місце ізоляції	Середовище синтезу антибіотику, г/л	Умови синтезу антибіотику	Назва сполуки	Концентрація антибіотику, мг/л	Джерело
<i>Clohesyomyces aquaticus</i> KF970	Антарктика	Соєвий пептон – 20, Манітол – 20, NaCl – 1,5	32 дні 28 °C pH 7,0	Ліндгоміцин	0,2	[11]
				Аскозетин	5	
<i>E. album</i> LF069	Тканина губки <i>Cacospinga scalaris</i> , Лімський фіорді, Хорватія	Солодовий екстракт – 17, Тропічна морська сіль - 15	21 дні 28 °C pH 6,4 статичні умови в темряві	Енгіодонтохон А	0,15	[12]
				Енгіодонтохон В	0,38	
				JBIR-97/98	0,4	
				JBIR-99	0,24	
<i>Trichoderma</i> sp. MF106	Гренландське море	Глюкоза – 10, Пептон – 5, Дріжджовий екстракт – 3, Солодовий екстракт – 3, Тропічна морська сіль - 30	20 дні 28 °C pH 6,8 статичні умови в темряві	Триходін А	0,26	[13]
				Піридоксатин	5,88	
<i>Stachybotrys</i> sp. MF347	Коряга, зібрана у Гельголанді, Північне море, Німеччина		22 дні 28 °C pH 6,8 статичні умови в темряві	Стахіїн Б	-	[15]
<i>Aspergillus</i> sp. OPMF00272	Тканина губки з острова Ішигакі в Оканаві, Японія	Вівсяне борошно - 50, Дріжджовий екстракт - 20, Тартрат натрію - 1, КН ₂ РО ₄ - 1, Справжня морська вода - 8	7 дні 27 °C статичні умови	Терретонін G	2,9	[10]
<i>Penicillium</i> sp. Y-50-10	з гідротермальних джерел Куейшантао біля Тайваню	Глюкоза – 30, Нарізна картопля – 200, Основа з морської води	21 дні 28 °C статичні умови	Метилізовер-рукозидинол	0,28	[19]

<i>A. candidus</i> KUFA	Тканина губки <i>Eriopolasia</i> sp., з коралового рифу в національному парку острова Сімілан, провінція Пханг-Нга, південний Таїланд	Зварений рис - 200	30 днів 28 °С твердофазне культивування	Преуссин	43,97 (мг/кг)	[16]
<i>Penicillium</i> sp. SCSGAF 0023	З корал <i>Dichotella gemmacea</i> у Південно-Китайському морі, Санья, провінція Хайнань, Китай	Глюкоза – 20, Нарізна картопля – 200, Морська сіль - 30	6 дні 28 °С 150 об/хв	Пеніциліксантон А	0,83	[17]
<i>N. fennelliae</i> KUFA 0811	Тканина губки <i>Clathria reinwardtii</i> , з острова Самаесан, Амфур Саттахіп, провінція Чонбурі, Таїланд	Зварений рис - 300	30 днів 28 °С твердофазне культивування	Паєцилін Е	35 (мг/кг)	[18]
<i>Stemphylium</i> sp. 33231	Мангрова <i>B. sexangula</i> var. <i>rhynchopetala</i> , в Південно-Китайському морі	Глюкоза – 15, Морська сіль – 30, Картопляний відвар	28 днів 25 °С статичні умови	Інфектопірон А	0,37	[20]
				Інфектопірон В	0,21	
<i>A. sydowii</i> ZSDS1-F6	Поверхня губки, з острова Сіша в Китаї	Крохмаль – 10, Поліпептон - 1	7 днів 28 °С рН 7,5 180 об/хв	Аспергілусен С	0,06	[21]

1.2.2. Ферменти

L-аспарагіназа відіграє життєво важливу роль у медичному застосуванні, зокрема в лікуванні гострого лімфобластного лейкозу як ефективний протипухлинний засіб. Грибковий ізолят *A. terreus*, який було виділено з морського середовища узбережжя Червоного моря Єгипту мав, найвищу специфічну активність l-аспарагінази (4,81 Од/мг білка). Найвищу продуктивність ферменту спостерігали на 5-ту добу, а параметри оптимізації становили рН 6,0, а температура 35 °С. Вихід також був високим при використанні декстрази та аспарагіну (8,26 Од/мг білка) як джерела вуглецю та азоту. Імобілізація з використанням *A. terreus*, адсорбованої на губці, підвищила вироблення ферменту в 1,33 рази порівняно зі звичайними вільними клітинами. Повторне використання адсорбованих клітин досягало максимальної питомої активності ферменту після трьох циклів (33,86 Од/мг білка) [22].

Виділені ізолянти грибів перевіряли на продукцію L-аспарагінази з використанням гліцерин-аспарагінового агару. Виходячи з утвореної зони рожевого кольору, три штами *Sarocladium kiliense* (BKJM1, BKJM2 і BKJM3) є доволі продуктивними для виробництва L-аспарагінази. Штам BKJM2 мав найвищу ферментативну активність - 18,9 Од/мл. Максимальний вихід L-аспарагінази (33,9 Од/мл) було одержано в макусі сонячних квітів. Морський ізолят перевіряли на цитотоксичну активність *in vitro* проти Jurkat J6 (лінія клітин лейкемії) та на Pa1 (лінія клітин раку яєчників). IC₅₀ була розрахована як 8,27% очищеного ферменту. L-аспарагіназа інгібувала ріст обох клітинних ліній [23].

A. terreus також здатний до продукування ферменту інулінази з недорогих субстратів під час твердофазного культивування. За оптимізованих умов активність інулінази (21,058 Од/грам твердого субстрату (гтс)) досягла прогнозованої максимальної активності, яка збільшилась приблизно в 4,79 рази порівняно з початковим продукційним середовищем. На етапі скринінгу шість джерел вуглецю використовували як субстрати для виробництва інулінази. Випробовували корінь цикорію, листя артишоку, листя банана, шкірку часнику, апельсинову шкірку та цукрову тростину як основні джерела карбону. Найкращі

результати показали листя артишоку, активність при цьому становила $4,433 \pm 0,121$ Од/гтс [24].

Було виявлено, що *A. terreus* є хорошим продуцентом хітинази. Максимальне виробництво хітинази було отримано при використанні 2% порошку панцирів креветок як єдиного джерела вуглецю в середовищі ферментації. Високий рівень продукції хітинази спостерігався в культуральному середовищі з рН 5 при 30°C протягом 5 діб в умовах струшування. Було виявлено, що хітиназа пригнічує ріст деяких перевірених фітопатогенних грибів, таких як *A. niger*, *A. oryzae*, *P. oxysporium*, *Rhizoctonia solani* та *Fusarium oxysporium* [25].

Ізолят *Cladosporium* sp., було виділено із морських губок, зібраних на острові Кінг-Джордж, Антарктида. Цей грибок було перевірено як нове джерело холодоактивних ксиланаз. *Cladosporium* sp. показали вищу ксиланолітичну активність при вирощуванні на ксилані деревини бука або берези та пшеничних висівках, але пшенична солома та вівсяні висівки не були такими хорошими індукторами цієї активності. Оптимальний рН для активності ксиланази становив 6,0, хоча стабільність рН була трохи ширшою (рН 5–7). З іншого боку, *Cladosporium* sp. показали високу ксиланазну активність при низьких температурах і дуже низьку термостабільність. Термічна стабільність була ще нижчою після того, як культуральне середовище було видалено та замінено буфером, що свідчить про те, що низькомолекулярний(і) компонент(и) культурального середовища може бути важливим для стабілізації активності холодної ксиланази [26].

Pestalotiopsis sp. NC16 – це галотолерантний та лігноцелюлолізований мангровий грибок із порядку *Xylariales*. Секвенування та збирання транскриптомів *de novo* показало, що цей грибок має понад 400 передбачуваних лігноцелюлозних ферментів, включаючи велику фракцію, залучену до деградації лігніну. Протеомні аналізи секретомів припустили, що присутність солі змінює склад лігноцелюлолітичного ферменту, збільшуючи секрецію ксиланаз і целюлаз і зменшуючи продукцію оксидаз. У результаті посилюється гідроліз целюлози та геміцелюлози, але зменшується розпад лігніну [27].

Існують роботи щодо визначення ультрафіолетового світла на синтез ферментів морських грибів. Гриби опромінювали 3 дозами УФ-світла - 500, 1000 і 1500 Гр. Найкращим отриманим ферментом була лігнінпероксидаза (676 Од/Л) *A. awamori* у дозі 500 Гр. Фермент пероксидази марганцю (1720 Од/л), що продукується трьома видами грибів (*Penicillium* sp.), був найвищим у дозі 500 Гр. *A. terreus* краще продукував фермент лакказу (980 Од/л) у дозі 500 Гр. Найкращим середовищем визначено на основі кукурудзяного екстракту. Використання гамма-випромінювання збільшило вироблення ферментів нитчастими грибами порівняно з тестами без опромінення. Опромінення в дозі 500 Гр стимулює *A. awamori*, *A. terreus* і *Penicillium* sp. виробляти ферменти фенолоксидази [28].

Морський мікроміцет *Trematosphaeria mangrovei* може синтезувати лакказу. Очищений фермент досяг своєї максимальної активності при температурі 65 °С, рН 4,0, концентрація становила 1,4 мМ, а активність - 184,84 Од/мг білка. Лакази каталізують окислення широкого діапазону субстратів, таких як орто- та пара-дифеноли, метоксизаміщені феноли, ароматичні аміни, фенольні кислоти та кілька інших сполук, пов'язаних із відновленням молекулярного кисню до води за допомогою механізму окиснення одним електроном. Субстратна специфічність лакказ варіюється від одного організму до іншого. Завдяки своїм цікавим каталітичним властивостям лаккази викликали значний інтерес у різних галузях промисловості [29].

Було виявлено, що морські дріжджеподібні гриби *Aureobasidium melanogenum* HN6.2 здатні продукувати естеразу $208,1 \pm 2,7$ Од/мл протягом 72 годин. Оптимальний рН і температура очищеної естерази становили 8,0 і 40 °С відповідно. Очищена естераза була стабільною при температурі менше 40 °С і в діапазоні рН 7,5-8,0. Естераза є одним із найважливіших ліполітичних ферментів, які беруть участь у гідролізі коротколанцюгових ефірів. Крім того, естераза також може каталізувати багато реакцій, таких як етерифікація, переетерифікація, ацидоліз і аміноліз. Ці ферменти привертають велику увагу, оскільки вони широко використовуються як промислові каталізатори в хімічній (синтез

коротколанцюгових жирних кислот і оптично чистих сполук), фармацевтичній (розщеплення рацемічних сумішей для синтезу чистих хімічних речовин), косметичі (модифікація тригліцеридів), харчова промисловість (синтез ароматичних ефірів), пральні порошки та біоремедіація навколишнього середовища (гідроліз забруднюючих речовин і пестицидів) [30].

Ізольований штам *T. reesei* SAF3 може синтезувати ксиланазу як при твердофазному так і при звичайному біосинтезі. Для виробництва на рідкому середовищі використовували пшеничні висівки, які сприяли максимальному виробленню ксиланазы 219 Од/ггс через 96 годин інкубації. Міцеліальна стадія грибів і внутрішньоклітинне накопичення катіонів Са і Mg індуковали максимальний синтез ферментів. Інокулятний рівень 10×10^6 спор на 5 г сухого твердого субстрату та активність води 0,6 виявились оптимальними для виробництва ксиланазы в умовах твердофазного культивування. Оптимальний час інкубації становив 96–99 год, концентрація твердого субстрату 10–12 г. Після оптимізації, рівень ксиланазы становив 299,7 Од/ггс [31].

Фермент танназа — це фермент, який використовується в багатьох біотехнологічних галузях, наприклад у хімічній промисловості, виробництві напоїв, фармацевтичній та харчовій промисловості. Цей фермент виділяли та очищали з морських *A. pomius* GWA5 фракційним осадженням 75% ацетоном з подальшою гель-фільтрацією. Найвища активність (291 Од/мг білка) була при рН 6,0 і 50 °С відповідно. Стабільність танназы спостерігалася в кислому діапазоні (4–6) і була стабільною до термічної обробки. За відсутності субстрату він зберігав приблизно 84,5% своєї активності при 80 °С протягом 15 хвилин. Mg²⁺ виступав як активатор чистого ферменту, тоді як EDTA, Cd²⁺, Pb²⁺ та Hg²⁺ пригнічували його активність і зберігали приблизно 40,78, 51,55, 30,24 та 24,55% активності відповідно [32].

В таблиці 1.3. показано можливість морських мікроміцетів щодо синтезу ферментів.

Ферменти, що синтезують морські мікроміцети

Мікроміцет	Місце ізоляції	Середовище синтезу ферменту, г/л	Умови синтезу ферменту	Назва ферменту	Концентрація ферменту, г/л	Активність, Од/мл	Джерело
<i>S. kiliense</i> BKJM2	Затока Велі-Біч у штаті Керала	Соняшникова макуха - 5	4 дні 37 °С твердофазне культивування		-	33,9	[23]
<i>A. terreus</i>	Морське середовище узбережжя Червоного моря, Єгипет	Аспарагін - 4,5, КН ₂ РО ₄ - 1,5, К ₂ НРО ₄ - 0,5, MgSO ₄ ×7Н ₂ О - 0,75, NaCl - 37,5, Глюкоза - 5	5 днів 35 °С рН 6,0 статичні умови	L-аспарагіназа	3,45	10,97	[22]
	Гнила деревини, зібрані в Ісмаїлії біля моря, Єгипет	Глюкоза – 10, Сахароза – 10, Листя артишоку – 3, NH ₄ H ₂ PO ₄ – 10, КН ₂ РО ₄ – 8, CaCl ₂ – 0,67 MgSO ₄ – 0,6	4 дні 30 °С рН 8,5 твердофазне культивування	Інуліназа	-	21,058 (Од/ггс)	[24]
	Донні морські відкладення, Саудівській Аравії	К ₂ НРО ₄ – 1,73 КН ₂ РО ₄ – 0,68 MgSO ₄ ×7Н ₂ О – 0,1, FeSO ₄ ×7Н ₂ О – 0,03, NH ₄ NO ₃ – 1, CaCl ₂ ×2Н ₂ О – 0,02, Порошок панцирів креветок - 20	15 днів 30 °С рН 5 120 об/хв	Хітиназа	1,13	5,45	[25]
<i>A. melanogenum</i> HN6.2	Осад морської соляної шахти в Циндао, Китай	Оливкова олія – 10, Кукурудзяний екстракт – 10, К ₂ НРО ₄ – 1, MgSO ₄ ×7Н ₂ О – 0,5	3 дні 28 °С рН 6,0 180 об/хв	Естераза	3,9	208,11 ± 2,73	[30]

<i>Cladosporium</i> sp. E2B- C1III(GPY)B	Поверхня губок, з острову Кінг- Джордж, Антарктида	Ксилан букового дерева – 10, NaCl – 2, KCl – 0,5, C3H7MgO6P – 0,5, FeSO4 – 0,01, K2SO4 – 0,35, Сахароза - 30	2 дні рН 6,0 статичні умови	Ксиланаза	-	195	[26]
<i>T. reesei</i> SAF3	Мангрові відкладення, Західна Бенгалія, Індія	CaCl2 – 0,6, MgSO4 - 0,6, (NH4)2SO4 – 2, KH2PO4 – 1, K2HPO4 – 1, Ксилан берези - 10	3 дні 30±2 °С рН 6,0 200 об/хв		0,34	4,75	[31]
<i>A. terreus</i> BG	Морська вода поблизу порту Суапє, Пернамбуку, Бразилія	KH2PO4 - 1, K2HPO4 - 1, NH4NO3 - 1, MgSO4,7H2O – 0,2, FeCl3 – 0,05 CaCl2 – 0,02 Кукурудзяний екстракт – 40	4 дні 30 °С рН 5,6 150 об/хв	Лігнін пероксидаза	-	0,85	[28]
<i>Penicillium</i> sp. BG				Пероксидаза магнію		1,7	
<i>A. awamori</i> RE				1,65			
<i>A. terreus</i> LIO				1,1			
<i>T. mangrovei</i>	Гнила деревина, з Абу Кір, Александрія, Єгипет	Сахароза – 16, Пептон – 20, Дріжджовий екстракт – 1, Морська вода – 500, CuSO4 – 0,4	20 днів 25 °С рН 6,0 статичні умови	Лакказа	1,5	277,26	[29]
<i>A. nomius</i> GWA5	Морські відкладення Західної Гавані, Александрія, Єгипет	(NH4)2SO4 – 1, K2HPO4 – 1, KH2PO4 - 0,5, MgSO4×7H2O - 0,5, CaCl2×H2O - 0,02, FeSO4×7H2O - 0,001, NaCl - 20	3 дні 30 °С рН 6,0	Танназа	16,88	705,6	[32]

1.2.3. Барвники

Гриби стали ключовим джерелом природних продуктів, незважаючи на поширеність різних інших типів мікробів у морській екосистемі. Їх все частіше використовують для виробництва пігменту. Було виявлено, що штам *A. nidulans* JAS3 продукує пігмент блідо-жовтого кольору ($11,5 \pm 0,5$ г/л) при глибинному культивування на середовищі Чапека при 28 ± 2 °С. Кольоровий пігмент продемонстрував хорошу протимікробну, протизапальну, антиоксидантну, антипротеїназну та антиобростаючу дію проти різних клінічних патогенних штамів, тим самим доводячи його терапевтичну важливість [33].

Деякі види *Talaromyces* виробляють велику кількість азафілонових червоних пігментів, подібних до *Monascus*, без будь-яких токсинів. *T. albobiverticillius* 30548 було виділено із зовнішнього схилу коралового рифу острова Реюньйон в Індійському океані. Біосинтезовані внутрішньоклітинні та позаклітинні пігменти екстрагували послідовними холодними екстракціями. На основі отриманих результатів було виявлено чотири пігменти, попередньо визначені як типу *Monascus*. Пігмент PP-O мав червоно-помаранчевий колір, N-глутарил рубропунктамін та 6-[(Z)-2-карбоксивініл]-NGABA-PP-V – червоний, N-треонін монаскорубрамін - фіолетово-червоний [34].

A. tamarii також входить до кола морських мікроміцетів, що синтезують пігменти. Даний продуцент синтезує зелені, ціанові та сині пігменти. Проте, мінусом цього агента варто виділити час одержання – 28 діб, а кінцева концентрація зеленого пігменту при цьому становить 2,4 мг/л, сині – 2,5 мг/л, ціанові – 2,53 мг/л. Пігменти володіли антиоксидантними властивостями, а також протимікробними (особливо проти *S. pyogenes* та *Chrysosporium keratinophilum*) [35].

Морські гриби, виділені з морських відкладень узбережжя Парангіпеттай, були ідентифіковані як *Rhodotorula evergladensis*, *A. sydowii* і *T. coalescens*. Виявлено, що пігменти з *R. evergladensis* та *A. sydowii* мають багатообіцяючу антибактеріальну дію проти патогенів людини, таких як *E. coli*, *B. cereus*, *Shigella* sp, *Salmonella typhi* і *Klebsiella pneumoniae*. Крім того, 2,2-дифеніл-1-

пікрілгідразил (DPPH) і активність поглинання іонів пероксиду показали 65% і 70% антиоксидантного потенціалу для пігментних екстрактів *R. evergladensis* і *T. coalescens* відповідно [36].

Ізолят асоційованого з губкою грибка MT23 було ідентифіковано як *T. parareesei*. Грибковий пігмент можна було екстрагувати лише в метанолі з виходом $6,22 \pm 0,29\%$. Пігмент міг інгібувати мультирезистентні (MDR) штами *S. typhi* та *E. coli*. Найбільшу антибактеріальну активність виявила концентрація 1000 мкг/мл проти *S. typhi* із зоною інгібування $4,03 \pm 0,06$ мм. Бактерії MDR – це бактерії, які вже стійкі до кількох антибіотиків, які мають бути ефективними для пригнічення росту бактерій. Це велика проблема для охорони здоров'я [37].

Штам-продуцент червоно-помаранчевого пігменту *P. mallochii* TACB-16, був виділений з кори бука біля моря в Балікесір, Туреччина. Результати показали, що пігмент був стійкий до різних температур і значень рН. Гліобластома (астроцитом IV ступеня, WHO3) є найбільш летальним підтипом гліоми, і відсоток виживаності пацієнтів із цим захворюванням все ще низький. Одержаний пігмент демонструє антипроліферативну дію на лінію клітин T98G [38].

Зелений пігмент було виділено з *Penicillium* sp. MF5. Він проявляв високу антагоністичну активність щодо тест-патогенів (MRSA), *E. coli*, *K. pneumoniae* та *P. aeruginosa*, *B. subtilis*). Виробництво пігменту зі штаму MF5 можна отримати глибинною ферментацією та твердофазною. Пігмент екстрагували етилацетатом. Мінімальна інгібуюча концентрація очищеної сполуки становила 12,5 мкг/мл для *B. subtilis* [39].

Було ізольовано вісім штамів з сольових морських печер Бразилії. Були ідентифіковані як *A. sydowii* CML2967, *A. aureolatus* CML2964, *A. keveii* CML2968, *P. flavigenum* CML2965, *P. chermesinum* CML2966, *Epicoccum nigrum* CML2971, *Lecanicillium aphano cladii* CML2970 і *Fusarium* sp. CML2969. Складні середовища, такі як картопляна декстроза та солодовий екстракт, сприяли підвищенню виробництва пігменту. Кольорові сполуки оспореїн, оревактаєн і дигідротриходімерол були ідентифіковані в екстрактах *L. aphanocladii* CML2970, *E. nigrum* CML2971 і *P. flavigenum* CML2965, відповідно [40].

В табл.1.4. вказано барвники, які синтезуються морськими мікроміцетами.

Пігменти, що синтезують морські мікроміцети

Мікроміцет	Місце ізоляції	Середовище синтезу пігменту, г/л	Умови синтезу пігменту	Колір	Концентрація пігменту, г/л	Джерело
<i>A. nidulans</i> JAS3	Тірумуллаварам, Коллам, Індійський океан	Сахароза – 30, NaNO ₃ – 2, K ₂ HPO ₄ – 1, MgSO ₄ – 0,5, KCl – 0,5, FeSO ₄ – 0,01	8 днів 28±2 °C pH 7,3 200 об/хв	Блідо-жовтий	11,5 ± 0,5	[33]
<i>Penicillium</i> sp. MF5	Мангрові відкладення лісу Калакад Мундантурай, Західні Гати, Тамілнад, Індія		14 днів 28 °C	Зелений	5	[39]
<i>T. albobiverticillius</i> 30548	Схил коралового рифу острова Реюньон в Індійському океані		8 днів 24 °C 150 об/хв	Червоний	6	[34]
<i>E. nigrum</i> CML2971	Сольові морські печери Бразилії	Нарізана картопля - 200	7 днів 30 °C 150 об/хв	Помаранчевий	0,044	[40]
<i>A. tamarii</i>	Морські осадження, Індія	Глюкоза – 40, Пептон – 10	28 днів 25±2 °C pH 5,6 ± 0,2	Зелений	0,0024	[35]
				Ціановий	0,00253	
				Синій	0,0025	
<i>R. evergladensis</i> <i>A. sydowii</i> <i>T. coalescens</i>	Узбережжя Парангіпеттай	Солодовий екстракт – 3, Дріжджовий екстракт – 3, Пептон – 5, Глюкоза – 10, Хлорамфенікол – 0,2	7 днів 28±2 °C	Зелений Червоний Зеленувато-чорний	10,44 7,56 9,04	[36]
<i>T. parareesei</i>	Морська губка з затоки Телук Авур, Джепара, Центральна Ява		14 днів 23 °C pH 5,4	Жовтий	0,94	[37]
<i>P. mallochii</i> TACB-16	Кора бука біля моря в Балікесір, Туреччина	Солодовий екстракт – 30, Пептон - 5	18 днів 30 °C 160 об/хв	Червоно-помаранчевий	5,4	[38]

1.2.4. Інші речовини

Бетулін — це пентациклічний тритерпеноїд, який найчастіше зустрічається в корі кількох видів берези. Проте, нещодавно стало відомом про синтез цього полікетиду за допомогою морських мікроміцетів. *Paecilomyces* WE3-F було виділено з морських опадів Червоного моря, Шалатін, Єгипет. Умови культивування, такі як кислий рН і кількість внесеного інокулята сприяли синтезу біоактивним метаболітам. Одержаний бетулін мав антагоністичну активність як проти грамполозитивних (*B. cereus*, *Lesteria monocytogenes*, *M. luteus* та *S. aureus*), так і проти грамнегативних (*Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium* sp, *Pseudomonas aeruginosa* та *Vibrio cholera*) бактерій. Дане визначення визначили за допомогою методу зони затримки росту, який становив в середньому 24 та 26 мм відповідно для кожної групи. Концентрація полікетиду становила близько 83,4 мг/л [41].

Acinetobacter baumannii, грамнегативна, нерухома, інкапсульована коккобацила, яка викликає інфекції в усьому світі. Альгікольним ендоефітний гриб *P. polonicum*, виділеним із морської зеленої водорості *Chetomorpha antennina*, може синтезувати наночастинки срібла (AgNPs), які мають антагоністичну дію проти *A. baumannii*. Антибактеріальну ефективність AgNPs проти мультирезистентних *A. baumannii*, що утворюють біоплівки, оцінювали за допомогою аналізу дифузії. MIC AgNP становила 15,62 мкг/мл, а мінімальна бактерицидна концентрація (MBC) становила 31,24 мкг/мл, а зона інгібування росту становила $21,2 \pm 0,4$ мм. Кінетичний аналіз виявив повне знищення бактеріальних клітин протягом 6 годин [42]. Також, морські гриби *C. halotolerans* також можуть синтезувати AgNPs з подібними властивостями [43].

Виробництво наночастинок золота (AuNPs) біологічним шляхом було досліджено з використанням ізоляту грибів морського походження, а саме *A. sydowii*. Примітним спостереженням було те, що спосіб біосинтезу (позаклітинний/внутрішньоклітинний) залежав від концентрації іонів золота. При нижчих концентраціях іонів золота були отримані частинки більшого розміру, тоді як більш високі концентрації підтримували синтез менших частинок. Було

виявлено, що частинки, біосинтезовані при 3 мМ хлориду золота, мають сферичну та майже монодисперсну природу. Було виявлено, що розмір частинок становить 8,7–15,6 нм із середнім діаметром 10 нм [44].

Також, мікроміцети можна використовувати для синтезу нових харчових продуктів. Наприклад, є дослідження, в якому біомасу водоростей *Macrocystis pyrifera* та відходів морських водоростей з бурих макроводоростей використовували для культивування морського гриба *Paradendryphiella salina*. Продукт, що утворюється після ферментації, міцелій *P. salina* разом з гідролізованими водоростями, називається мікопротеїном. Вміст загального білка збільшився на 141% у ферментованому *M. pyrifera*, а загальний вміст амінокислот збільшився на 73,5%. У той час як у ферментованих відходах морських водоростей білок збільшився на 131%. Крім того, ферментація *M. pyrifera* та відходів морських водоростей позитивно вплинула на загальне зниження вуглеводів на 38% та 35% відповідно. Згідно з цими результатами, ферментація підвищує поживну цінність біомаси морських водоростей, і її потенціал порівнюють з Quorn, мікопротеїном, який використовується в їжі. Крім того, загальна кількість фенольних сполук і антиоксидантна активність ферментованої біомаси морських водоростей значно збільшилися порівняно з неферментованою біомасою морських водоростей. Ферментовані відходи морських водоростей призвели до найвищого значення загального вмісту фенолів і вищої антиоксидантної активності зі збільшенням на 180,9 і 86,3% відповідно [45]. Відомі й інші випадки синтезу мікопротеїну з цим же грибом, але з водоростями *Ulva spp* [46].

Відомо, що морські мікроміцети синтезують екзополісахариди. Гомогенний позаклітинний полісахарид, позначений AWP, був виділений із ферментованої рідини морського гриба *A. versicolor*, виділеного з корала *Cladiella sp.* Хімічний і спектроскопічний аналізи показали, що AWP складався з глюкози та манози в молярному співвідношенні 8,6:1,0 [47]. Екзополісахарид AS2-1 був отриманий із ферментованого бульйону ендогенного гриба морської губки *Alternaria sp.* SP-32. Результати хімічного та спектроскопічного аналізів показали,

що AS2-1 складається з манози, глюкози та галактози з молярним співвідношенням 1,00:0,67:0,35. AS2-1 володів високою антиоксидантною активністю, як було оцінено шляхом очищення 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразилу та гідроксильних радикалів *in vitro* [48]. YCP, як вид природних полісахаридів з міцелію морського нитчастого гриба *Phoma herbarum* YS4108, має великий протипухлинний потенціал через посилення імунної відповіді господаря [49]. З морського гриба *Hansfordia sinuosae* виділено нейтральний водорозчинний полісахарид (НРА). НРА в основному складається з манози з незначною кількістю галактози та глюкози. НРА продемонстрував помітний інгібуючий ефект на клітини HeLa карциноми шийки матки людини та клітини MCF-7 карциноми молочної залози людини, коли клітини інкубували з НРА при 400 мкг/мл [50]. Нитчасті гриби *F. equiseti* ANP2, з хорошим виходом екзополісахариду ($4,9 \pm 0,25$ г/л), були виділені з мангрових відкладень естуарію Крішна. Екзополісахарид MF-1 в основному складається з манози (72,6%) і глюкози (27,3%). Здатність поглинати гідроксильні радикали вказує на те, що MF-1-EPS має хорошу антиоксидантну активність [51].

Морські індольні алкалоїди є все більш зростаючим класом вторинних метаболітів. Індольні алкалоїди мають високу структурну різноманітність. Було виявлено, що деякі з них володіють різноманітною біологічною активністю, такою як цитотоксична, противірусна, антиплазмодіальна, протигрибкова, антибактеріальна та протизапальна активність, і тому є перспективними джерелами для розробки нових ліків. Склад живильного середовища має великий вплив на продукцію метаболітів морського гриба *Pseudallescheria boydii* F44-1. Додаючи амінокислоти до культурального середовища GPY, з культурального бульйону було виділено два нових алкалоїди бісіндолу, псевдобоіндоли А і В. Виділений 3,3'-циклогексиліденбіс(1Н-індол) продемонстрував цитотоксичну активність проти різних ліній ракових клітин [52]. Курвуламін — це ще один антимікробний алкалоїд, що виробляється морським грибом *Curvularia* sp. IFB-Z10. Кулькоподібний ріст грибів позитивно впливає на утворення курвуламіну, а сахароза, дріжджовий екстракт і нітрат натрію виявилися найбільш придатними

для утворення курвуламіну. На синтез алкалоїду впливали умови культивування. Продуктивність була покращена до 17,97 мг/л за допомогою приготування гомогенізованого посівного бульйону з використанням колби з перегородкою. При додаванні порошку тальку (200 меш, 5 г/л) титр ферментації досяг 33,05 мг/л, що було приблизно в 1,9 раза більше, ніж контроль [53]. Морський антрактичний гриб *P. echinulatum*, може синтезувати 4 алкалоїди: циклопенін, дегідроциклопептин, віридікатин і віридікатол. Всі речовини володіли антиоксидантними властивостями [54]. Вплив добавок L-триптофану на виробництво вторинного метаболіту в грибі морського походження *Fusarium* sp. L1 призвів до синтезу індолітичних алкалоїдів. Сполука фузаїндотерпену В показав інгібіторну активність проти вірусу Зіка у стандартному аналізі бляшок зі значеннями EC₅₀ 7,5, мкМ, не виявляючи значної клітинної цитотоксичності проти лінії клітин A549 аденокарциномного альвеолярного базального епітелію людини [55].

Інгібітори ферментів описуються як сполуки або агенти, які поєднуються з ферментом таким чином, щоб запобігти нормальній комбінації субстрат-фермент і каталітичній реакції [56]. Більшість лікарських засобів, які функціонують через інгібування ферментів, взаємодіють зі своїм цільовим ферментом через прості оборотні механізми зв'язування. Тому, інгібітори ферментів іноді відіграють ключову роль щодо ефективності лікарських засобів [57]. Два нових димери оксафеналенону, талароміцезон А і талароміцезон В, і новий ізопентенілксантенон, талароксантенон, були виділені з культурального бульйону та міцелію морського гриба *Talaromyces* sp. LF458. Талароміцезон А і В показали потужну антибактеріальну активність з IC₅₀ 3,70, 17,36 мкМ відповідно проти патогенних для людини штамів *Staphylococcus*. Талароміцезон А, і талароксантенон показали потужну інгібіторну активність до ацетилхолінестерази з IC₅₀ 7,49, 1,61 мкМ відповідно. Фосфодіестераза PDE-4B2 була інгібована талароксантеноном (IC₅₀ 7,25 мкМ) [58]. Ендофітний гриб *F. equiseti* був виділений з бурі водорості *Padina pavonica*, зібраної з Червоного моря. Гриб синтезував дикетопепразинів і антрахінонів. Виділені сполуки перевіряли на

інгібування протеази вірусу гепатиту С NS3/4A. У результаті грибокві метаболіти продемонстрували інгібування протеази ВГС (IC_{50} від 19 до 77 мкМ) [59]. Речовина проти *Chromobacterium violaceum* CV026 і *P. aeruginosa* PA01 була виділена та очищена з сирих екстрактів морського гриба *P. chrysogenum* DXY-1. Цей циклічний дипептид у субмінімальній інгібуючій концентрації може зменшити регульовану продукцію віолацеїну *C. violaceum* CV026 на 79%, а опосередковану продукцію піоціаніну, протеази та активність еластази *P. aeruginosa* PA01 на 41%, 20% і 32% відповідно. Крім того, він також може руйнувати утворення біоплівки *P. aeruginosa* PA01 [60]. Етилацетатний екстракт ендоефітного гриба *A. versicolor* виявляв значну активність проти протеази HCV NS3/4A зі значенням IC_{50} 30 мкг/мл. Гриб був виділений з чорноморської губки *Spongia officinalis* Червоного моря [61].

Терпеноїди — це клас природних продуктів. Вони були вперше описані як компоненти рослинних ефірних олій [62]. Морський штам *Mariannaea humicola* IG100 продемонстрував значну протигрибкову активність, пов'язану з двома активними сполуками, терпеноїдами терперстацином і 19-ацетил-4-гідроксидіктіодіолом. Їхні значення MIC були виміряні для *A. flavus* (7,9 мкг/мл і 31,3 мкг/мл відповідно), *P. griseofulvum* 25 мкг/мл та 100 мкг/мл відповідно) та *T. pleuroticola* (> 500 мкг/мл та 125 мкг/мл відповідно [63]. Дослідження екстракту *Nemania bipapillata* AT-05, виділеного з морської червоної водорості *Asparagopsis taxiformis* могли синтезувати терпеноїди. Неменондіол В слабо інгібував ацетилхолінестеразу, тоді як гідрокси-ботрієналол інгібував як ацетилхолінестеразу, так і бутирилхолінестеразу [64]. Новий меротерпеноїд, таладріманін А, виділено з морського гриба *Talaromyces* sp. NM6-1-1. У біоактивному аналізі він виявив протипухлинну активність проти клітин раку шлунка MGC803 і MKN28; він також пригнічував утворення колоній та індукував апоптоз у клітинах MGC803 залежно від концентрації. Крім того, у цьому дослідженні терпеноїд виявив селективну антибактеріальну активність проти *S. aureus* 6538P і низьку активність щодо штамів *V. parahaemolyticus* і *E. coli* [65].

РОЗДІЛ 2

ВИКОРИСТАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ФАРМАЦІЇ

2.1. Бактеріальні інфекції

Стійкість до антимікробних препаратів не є новою дилемою. Цей тип резистентності є загрозою для всіх галузей медицини та охорони здоров'я. Це загрожує лікуванню інфекційних захворювань, таких як інфекція кровотоку, шлунково-кишкові захворювання, інфекції сечовивідних шляхів, нозокоміальні захворювання, менінгіт і бактеріємія. Нераціональне використання антибіотиків протягом багатьох десятиліть призвело до епохи мультирезистентних бактерій. Ця проблема стала основною причиною скорочення кількості ліків, що призвело до зростання смертності. Ці бактерії виявили стійкість до таких антибіотиків, як амікацин, амоксицилін-клавуланова кислота, азтреонам, цефазолін, цефтазидим, цефотаксим, цефалоспорин, цефуроксим, ертапенем, іміпенем, фосфоміцин, фторхінолони, гентаміцин, меропенем і піперацилін тазобактам [66].

Індольні алкалоїди, вторинні метаболіти, виділені з *P. aurantiogriseum*, мають антибактеріальну дію. Цитоскірини, вторинні метаболіти *C. lunata*, виявляють антимікробну активність. В іншому дослідженні було показано, що 2'-дезоксириболактон, гексилітаконова кислота та вторинні метаболіти ергостеролу, екстраговані з *Curvularia* sp. також мають антимікробну дію [66].

Дослідження вторинних метаболітів з культурального бульйону неідентифікованого мангрового гриба А1 призвело до виділення нового глікозиду жирної кислоти, відомого як метиловий ефір-3-О- α -L-рамнопіранозид R-3-гідроксіундеканової кислоти, який виявляв інгібіторну активність проти MRSA. Антимікробний потенціал етилацетатних екстрактів 70 штамів ендоефітних грибів, виділених з листя бразильської мангрової рослини

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Айсіна А.В.</i>				РОЗДІЛ 2 ВИКОРИСТАННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ФАРМАЦІЇ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>						34	118
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Laguncularia racemosa (L.) Gaertn. було оцінено проти бактерій *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *E. coli* та *P. aeruginosa*. З цих 70 штамів 34 (48,6%) штами ендоефітних грибів були здатні продукувати вторинні метаболіти з антимікробною активністю, а неочищені екстракти *A. niger*, *C. pallescens*, *Guignardia bidwelii*, *P. variotii* та *Mycelia sterilia* показали найкращі результати. Подібним чином чотири нових меротерпени, гіньярдони F–I, разом із двома відомими сполуками гіньярдони A і B були виділені з ендоефітного гриба A1. Усі сполуки оцінювали на інгібіторну активність щодо MRSA [67].

Антибактеріальну активність має морський гриб *P. herbarum*, у концентрації 100 мкл проти *M. leuteus* та *V. cholerae*. Фалатні похідні цього гриба продемонстрували багатообіцяючий потенціал антибактеріальної активності. Біоактивні метаболіти *P. microspora* VB5, виявили антимікробну дію проти бактерій *B. subtilis* (ATCC 6633), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) і *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Антибіотичну сполуку, що містить індол і дикетопіперазин, було виділено з *P. chrysogenum* MTCC 5108. Вона виявила значну активність проти *V. cholerae* MCM B 322, збудника холери у людей. Ендоефітний гриб № 1893 був виділений на узбережжі Південно-Китайського моря. Етилацетатний екстракт цього гриба продемонстрував високу активність проти *Heliothis armigera* (Hühner) і *Sinergasilus* sp. Новий ізопренілфеніловий ефір, було виділено з мангрового гриба (№ B60) з Південно-Китайського моря. Ця сполука виявляла антибактеріальну та протигрибкову активність. Ізопренілфеніловий ефір також також пригнічує цитотоксичність клітинної лінії hepG2 зі значенням IC₅₀ 10,0 мг/мл [67].

Культура факультативного морського аскоміцета *Zopfiella latipes*, спочатку виділеного з ґрунту Індійського океану, є джерелом зопфіелламідів A і B, які помірно активні проти *A. citreus*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Corynebacterium insidiosum*, *M. leuteus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces* sp., і *Acinetobacter calcoaceticus*. MIC становить від 2 до 10 мг/мл для зопфіелламідів. Галороселліни A і B разом із 3-ацетил-7-гідрокси-5-метокси-3,4-диметил-3H-ізобензофуран-1-оном були виділені з морського гриба *Halorosellinia oceanica*.

Похідне ізобензофуран-1-ону виявляє помірну антимікобактеріальну активність з MIC = 200 мкг/мл [68].

2.2. Лікування ракових клітин

Авраїнвіламід, був виділений з морського гриба *Aspergillus* sp. CNS358. Авраїнвіламід має дозозалежну цитотоксичну дію проти різноманітних ліній пухлинних клітин, включаючи клітини НСТ116 товстої кишки людини (IC₅₀ = 2,0 мкг/мл), клітини меланоми MALME-3М (IC₅₀ = 53 нМ) і два типи раку молочної залози, βТ-549 (IC₅₀ = 34 нМ) і Т-47D (IC₅₀ = 72 нМ). Стефацидини А і В були отримані з *A. ochraceus* WC76466. Ці індольні алкалоїди мають сильну протипухлинну дію проти кількох клітинних ліній. Стефацидин В є сильнішим, ніж А, у 5–30 разів, і найсильніша цитотоксичність для А і В спостерігалася в тестостеронзалежних ракових клітинах LNCaP простати зі значеннями IC₅₀ = 1,0 і 0,06 мкг/мл відповідно [69].

Два цитотоксичні ліпопептиди, фелутаміди С і F, були виділені зі штаму *A. versicolor*. Було виявлено, що вони є цитотоксичними для ліній ракових клітин людини XF498 і НСТ15 зі значеннями IC₅₀ 3,9 і 3,1 мкг/мл відповідно. Фелутамід F був більш цитотоксичним для п'яти ліній ракових клітин людини, тобто SK-MEL-2, XF498, НСТ15, SK-OV-3 та А549 (значення IC₅₀ 0,13–1,81 мкг/мл). Фелутаміди С і F структурно подібні до фелутамідів А і В, які вперше були виділені з рибного гриба *P. fellutanum*. Ці речовини є потужними токсинами зі значеннями IC₅₀ в діапазоні від 0,1 до 0,8 мкг/мл проти клітин мишачого лейкозу Р388 і L1210 і клітин KB епідермоїдної карциноми людини [69].

Отриманий з пляжного піску *A. versicolor* утворив два нових метаболіти, коттелосини А і В. Вони виявили слабку цитотоксичність для меланоми людини MM418c5 (EC₅₀ = 66 мкг/мл), клітинні лінії раку простати DU 145 (EC₅₀ = 90 мкг/мл) і Т47D молочної залози (EC₅₀ = 94 мкг/мл). Пептид, аспергіламід А, був виділений з міцелію штаму *Aspergillus*, отриманого з морських опадів, і виявлено, що він демонструє помірну цитотоксичність (IC_{50M} = 16 мкг/мл) для клітин карциноми товстої кишки людини НСТ-116 [69].

Шість нових пренільованих індолових дикетопіперазинових алкалоїдів, спіротрипростатинів С-Е, два похідних фумітреморгіну В і 13-оксоверрукулоген були виділені зі штаму *A. fumigatus*. Ці сполуки оцінювали на їх цитотоксичність проти клітин MOLT-4, HL-60, A549 і BEL7402. Усі вони показали вибіркочувальну активність щодо цих чотирьох ліній ракових клітин, і подальший аналіз показав, що сполуки похідних фумітреморгіну В і 13-оксоверрукулоген були більш потужними проти клітин MOLT-4, HL60 та A549 (діапазон $IC_{50} = 1,9-11,6$), ніж сполуки 21–23 (діапазон $IC_{50} = 17,5-98,4$) [69].

Аспернолід А був виділений з *A. terreus*, виявляв помірну цитотоксичність проти лінії клітин H460 з $IC_{50} 88,0$ мкМ. Нову сполуку, що містить оксепін, протубоксепін А було виділено з морських відкладень *Aspergillus* sp. Він продемонстрував слабку інгібіторну активність проти клітин HL-60 з $IC_{50} = 75$ мкМ. Нацетилтирамін був виділена з морських осадів *A. fumigatus* і виявилася цитотоксичною для клітин K562 ($IC_{50} = 17,4$ мкМ) [69].

Три нові дріманові сесквітерпеноїди були ідентифіковані в штамі *A. ustus*. Ці речовини показали цитотоксичність щодо панелі ліній пухлинних клітин, включаючи клітини L5178Y, HeLa та PC12, зі значеннями EC_{50} у діапазоні від 0,6 до 5,3 мкг/мл. Штам *A. ustus* також міг синтезувати похідне ізохроману – устусолати. Він продемонстрував значну цитотоксичність проти клітин HL-60 з $IC_{50} = 0,13$ мкМ, тоді як устусолат С, продемонстрував помірну цитотоксичність проти клітин A549 і HL-60 з $IC_{50} 10,5$ мкМ. Устусолат А продемонстрував слабку цитотоксичність проти клітин HL-60 і A549 зі значеннями $IC_{50} 20,6$ і $30,0$ мкМ відповідно [69].

Новий антрахінон, аспергіолід А, було виділено з гриба *A. glaucus*, що походить із морських відкладень. Сполука показала цитотоксичність проти клітинних ліній A-549, HL60, BEL-7402 і P388 зі значеннями $IC_{50} 0,13, 0,28, 7,5$ і $35,0$ мкМ відповідно. Нещодавно тестування *in vivo* показало, що аспергіолід А ефективно пригнічує ріст пухлини на моделі гризунів. Аспергіолід В продемонстрував сильну цитотоксичність проти клітинних ліній HL-60 і A-549 зі значеннями $IC_{50} 0,15$ і $0,24$ мкМ відповідно. Інші спіроциклічні аналоги інгібували

активність рецепторної тирозинкінази зі значеннями IC_{50} від 1,8 до 9,4 мкМ. (Транс)-емодин-фізіон біантрон, показала помірну цитотоксичність проти клітинних ліній HL-60 і A-549 зі значеннями IC_{50} 7,8 і 9,2 мкМ відповідно. Його цизізомер, також показали порівнянну цитотоксичність зі значеннями IC_{50} 44,0 і 14,2 мкМ відповідно [69].

2.3. Використання біологічних речовин мікроміцетів для інших захворювань

Мікроміцети розглядають також як потужні джерела противірусних метаболітів. Віруси простого герпесу ВПГ-1 і ВПГ-2 є важливими та поширеними патогенами людини з родини *Herpesviridae*. Незважаючи на численні повідомлення про природні продукти з інгібуючим ефектом проти ВПГ, комерційні препарати, як правило, обмежуються синтетичними противірусними засобами з природним фармакофором, такими як ацикловір, пенцикловір і фамцикловір. Галовіри А–Е були виділені з роду *Scytalidium*, виявляли *in vitro* противірусну активність проти ВПГ-1 і ВПГ-2. З *A. terreus* SCSGAF0162 було виділено 11а-дегідроксіізотерреулактон А, арізугацин А, ізобутиролактон II і аспернолід А, зі значеннями IC_{50} проти ВПГ-1 з 33,38, 12,76, 62,08 і 68,16 мкМ відповідно. Балтіколід, є одним із противірусних побічних продуктів нафталінону з штаму грибів 222, що належить до *Ascomycota*. Балтіколід продемонстрував потужну інгібіторну дію проти ВПГ-1 з $IC_{50} = 0,45$ мкМ [70].

ВІЛ, що викликає синдром набутого імунodefіциту (СНІД), є основним фактором, що сприяє підвищенню смертності від інфекційних захворювань у всьому світі. Еквізетин і його новий енантіомерний гомолог фомасетин, виділені з морських грибів *F. heterosporum* і *Phoma* sp., відповідно, продемонстрували інгібіторну активність *in vitro* проти ферменту інтегрази ВІЛ-1. З видів морських грибів, *Xylaria* sp., було виділено інтегральну кислоту, яка структурно подібна до еквізетину. Ці сполуки запобігають реакціям амальгамації, які каталізуються сполуками попередньої інтеграції, отриманими з ВІЛ-1-інфікованих клітин [70].

Кожні кілька років поява нового вірусу грипу зі смертельною патогенністю привертає увагу світу до значної кількості хворих пацієнтів і високого рівня

смертності. Стахіфлін виділено з *Stachybotrys* sp. RF-7260, викликав $IC_{50} = 0,003$ мкМ проти вірусу грипу А (H1N1), що можна порівняти з іншими противірусними засобами, такими як занамівір і амантадин. Було виявлено ефективний штам грибів, отриманий із мангрових дерев, *Cladosporium* sp., який синтезує побічні продукти гліантрипіну та піразинохіназоліну, з потенційними противірусними властивостями проти штаму H1N1 вірусу грипу. Аспертерестид А, отримана зі штаму грибів *A. terreus* SCSGAF0162, показав супресивний вплив на штами вірусу грипу А/WSN/33 (H1N1) і А/Hong Kong/8/68 (H3N2) зі значеннями IC_{50} 15 і 8,1 мкМ відповідно [70].

Противірусна активність означає знищення або пригнічення росту грибків. Противірусний препарат — це препарат, який використовується для лікування грибкових інфекцій, таких як мікоз (включаючи грибкову інфекцію у людини), мікоз стопи, дерматофітія, кандидоз та багато інших серйозних системних інфекцій [66].

Виділили вторинні метаболіти бензомальвіну С з гриба *P. raistrick*, які мають противірусну дію. Тенуазонова кислота, альтертоксин, альтернаріол, монометилловий ефір альтернаріолу та вторинні метаболіти, виділені з *Alternaria* sp. проявляють противірусну активність. У дослідженні гербарин-А, екстрагований із *C. albicans*, продемонстрував противірусну активність. Індольні алкалоїди, виділені з *A. flavus* та *F. solani*, а також флаваноїди екстраговані з *Helminthosporium* sp., показали противірусну активність. Вторинні метаболіти β -1,3-глюканолітика, виділені з *F. solani*, також мають антифунгальні властивості. Сестертерпеноїди, витягнуті з *A. insuetus*, виявляють противірусну та протипухлинну дію. Два вторинних метаболіти флаваноїди та нафтохінони, що мають противірусну дію, були екстраговані з *Colletotrichum acutatum* та *Edenia gomezpotrae* [66].

Три метаболіти під назвою Фомопсин А-С разом з двома відомими сполуками Цитоспорон В і С були виділені з *Phomopsis* sp. ЗСУ-Н76. Цитоспорони В і С інгібували два гриби *C. albicans* і *F. oxysporum* з МІС у діапазоні від 32 до 64 мкг/мл [67]. *Keissleriella* sp. синтезує противірусні

метаболіти (в загальному нафталіні) проти *C. albicans*, *Tricophyton rubrum* та *A. niger* [68].

ВИСНОВКИ

1. Морські мікроміцети в загальному представлені типами *Ascomycota* та *Basidiomycota*. Місця виділення цих грибів варіюються від узбережь та мангрових відкладень до гідротермальних джерел та просто місць, в яких неможливо уявити взагалі якоесь можливе існування мікробіоти. Екстремальність умов проживання виділених ізолятів є одним з важливих факторів виділення нових, ефективних вторинних метаболітів.

2. Мікрогриби морського походження характеризуються великою кількістю сполук, які вони можуть синтезувати. За допомогою мікроміцетів можна одержати нові антибіотики для лікування захворювань, спричинених мульти-резистентними патогенами, ферментів та їх комплексів, а також їх інгібіторів барвників, алкалоїдів, флаваноїдів, терпеноїдів та дуже багато інших речовин, яку людству ще доведеться виділити.

3. Вторинні метаболіти морських мікроміцетів є бажаними сполуками через їх багатофункціональність. Якщо взяти до прикладу індоліві алкалоїди – ці речовини, в залежності від властивостей, можуть мати одночасно антибактеріальну, протигрибкову, антиоксидантну та протиракову дію. Наразі, актуальними дослідженнями є визначення небажаних побічних реакцій цих метаболітів на здоров'я людей.

4. В першу чергу, вторинні метаболіти морських мікроміцетів розглядають для вирішення питань мульти-резистентності бактеріальних патогенів. Особливе занепокоєння викликає метицилін-резистентні штами золотистого стафілокока. Крім того, за допомогою вторинних метаболітів грибів морського походження наразі розробляються препарати проти різних грибкових захворювань, в тому числі і мікозів.

5. Важливе значення вторинним метаболітам морських мікроміцетів надає їх цитотоксична дія. Сполуки цих грибів показують високі показники проти

різних ліній ракових клітин, що потенційно дає надію на більш ефективну боротьбу з онкологічними захворюваннями, які входять до загальних причин смертей у світі.

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі пеніцилону С, галузей використання, потреби у лікарському засобі проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу

Надзвичайна ситуація з MRSA є величезним тягарем для глобальної охорони здоров'я та гігієни. Завдяки наявності гена *mecA* в стафілококовій касетній хромосомі *mec*, MRSA розробив численні механізми резистентності, включаючи мутацію пеніцилінзв'язуючого білка (PBP), секрецію β -лактамази та ефлюксийний насос. Крім того, ці механізми можуть діяти одночасно, що призводить до кінцевої невдачі антибіотикотерапії. Тому важливо повністю зрозуміти детальні механізми резистентності, щоб вирішити проблему стійкості до ліків [3].

Зміна клітинної стінки бактерій

Тейхоева кислота бактеріальної стінки (ТК) є основним компонентом клітинної стінки грамозитивних бактерій і має різні структури в різних видів. ТК у клітинній стінці *S. aureus* складається з ~40 рибітолфосфатних повторюваних одиниць, модифікованих N-ацетилглюкозаміном і D-аланіном, і його вміст має велике значення для товщини клітинної стінки та стійкості MRSA до ліків. Було продемонстровано, що вміст ТК у клітинній стінці високовірулентних штамів MRSA значно вищий, ніж у менш патогенних штамів. Підвищений вміст ТК і товщина клітинної стінки також відповідають за стійкість до ванкоміцину [1,3].

Встановлено, що стійкість MRSA до даптоміцину пов'язана з мутацією

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	Айсина А.В.				РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН- РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	Резніченко Ю.М.						41	118
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	Стабніков В.П.							

генів, пов'язаних із клітинною стінкою, та інактивацією двокомпонентної регуляторної системи *vraSR*. Крім зміни товщини, змінюється і структура клітинної стінки. РВР — це сімейство внутрішньоцитоплазматичних білків, що містять від РВР1 до РВР5, з яких РВР4 бере участь у кінцевій стадії синтезу та зшивання пептидоглікану, що становить клітинну стінку. MRSA знижує експресію РВР4 і послаблює зв'язок клітинної стінки. При цьому цільова молекула препарату перетікає навколо клітини, і відповідний препарат захоплюється заздалегідь до того, як він потрапить у клітину, що ускладнює прояв його дії [1,3].

Крім того, ванкомицин-проміжний *S. aureus* (VISA) є типовою мутацією механізму резистентності клітинної стінки до ліків. Фенотип VISA помірного резистентного до ванкомицину *S. aureus* (МІК > 4 мг/мл) збільшує товщину клітинної стінки за допомогою різних шляхів стимуляції і знижує активність аутолізу ферментів, відповідальних за обмін клітинної стінки. Ізоляти VISA мають мутації *vraSR*, що призводить до посилення більш ніж 40 генів синтезу клітинної стінки, в тому числі для похідних клітинної стінки [3].

Зміна мембрани бактеріальної клітини

Ефлюксні насоси забезпечують механізм самозахисту, витісняючи антибіотики з клітини. Ефлюксні насоси існують на клітинних мембранах і використовують АТФ для вигнання субстратів із клітин, які володіють розширеним і перекриваючим розпізнаванням субстратів, включаючи фторхінолони, тетрацикліни, макроліди. Мутації в генах ефлюксного насоса та/або його регуляторних послідовностей можуть спричинити надмірну експресію ефлюксного насоса, тим самим підвищуючи стійкість до ліків і запобігаючи досягненню смертельної внутрішньоклітинної концентрації. Протягом цього часу бактерії шукатимуть інші ефективніші мутації, зрештою досягаючи високих рівнів клінічно значущої стійкості [1,3].

Для ліпопептидних антибіотиків, таких як даптоміцин, механізм дії полягає у формуванні невеликих міцел з іонами кальцію та вставці кальцію та фосфатидилгліцерину (ФГ) у клітинну мембрану для формування невеликих

проникних для катіонів каналів або екстракції ліпиду. MRSA викликає мутацію *mprF* (множинних пептидних факторів резистентності), який кодує фермент, відповідальний за ацилювання ФГ лізила (ЛФГ) та трансмембранний транспорт. Після мутації *mprF* центральна біфункціональна область зазнає більше амінокислотних змін, що посилює функцію цього ферменту, тим самим зменшуючи кількість ФГ на зовнішній мембрані, збільшуючи ЛФГ і переносячи більше позитивних зарядів [3].

Існують і деякі інші підходи. Оперон DTL відіграє певну роль у приєднанні позитивно зарядженого аланіну до ТК. Очевидно, посилення його експресії призведе до створення позитивної клітинної поверхні зі збільшенням електропозитивної ТК. Крім того, MRSA може змінити склад фосфоліпідів клітинної мембрани, що призведе до зменшення кількості ФГ на мембрані або зміни плинності клітинної мембрани. Це перешкоджатиме зв'язуванню та агрегації даптоміцину [3].

Інактивуючі препарати

Стійкість MRSA до пеніциліну в основному визначається геном *blaZ*, який кодує β -лактамази. Цей вид ферменту гідролізує специфічні ділянки β -лактамного кільця в молекулярній структурі препарату, що призводить до відкриття петлі та інактивації β -лактаму, оскільки препарат, що відкриває петлю, не може зв'язуватися з цільовим РВР. Більшість β -лактамаз кодуються плазмідними генами, які зазвичай несуть плазміди класу II. Більшість штамів *S. aureus* синтезують індукцибельні β -лактамази в присутності антибіотиків. Швидкість синтезу залежить від штамів і умов зростання. Іншим препаратом, який може бути інактивованим шляхом гідролізу, є тетрациклін, через ген *tetX* [1,3].

Бактерії також можуть передавати хімічні групи молекулам ліків для модифікації та інактивації. Відомо, що ацетилювання, фосфорилювання та аденілювання є найпоширенішими хімічними модифікаціями, індукованими бактеріями для стійкості до різних антибіотиків, таких як аміноглікозиди, хлорамфенікол і рифампіцин [1,3].

Зміна мішеней препарату

Метицилін подібний до нафциліну, оксациліну та клоксациліну. Вони належать до сімейства стійких до пеніцилінази пеніцилінів (PRP), які нелегко розкладаються β -лактамазами. Вони можуть зв'язуватися з PBP *S. aureus*. PBP - це клас транспептидаз, які беруть участь у транспортуванні попередників пептидів протеогліканів з цитоплазми до мембрани, беручи участь у будівництві пептидогліканів клітинної стінки. PBP також використовують ліпід II як субстрат, каталізуючи останні два етапи біосинтезу пептидогліканів, основного компонента клітинної стінки бактерій. Метицилін перешкоджає PBP шляхом кон'югації білка, впливаючи на подальший синтез пептидоглікану та перехресне зшивання. Подальше ослаблення або руйнування клітинної стінки зазвичай призводить до швидкого лізису бактерій. У лікарсько-стійких штаммах PBP з низькою спорідненістю (PBP2a) кодується головним чином геном *tesA* або *tesC*, який може продовжувати проявляти свою первісну ефективність, не порушуючись ліками. Іншою модифікацією PBP є заміна амінокислот у домені транспептидази, яка зазвичай включає PBP3 та/або PBP4 [1,3].

На додаток до PBP, D-Ala-D-Ala є іншою молекулою, тісно пов'язаною з синтезом клітинної стінки. Ванкоміцин зв'язується з D-Ala-D-Ala терміналом попередника ліпиду II за допомогою водневих зв'язків, розриваючи нижню збірку пептидоглікану та перешкоджаючи формуванню клітинної стінки. Механізм резистентності до ванкоміцину VRSA (MIK > 16 мг/мл) надається опероном *VanA*. *S. aureus* отримав цю плазмиду з *Enterococcus* у спільному середовищі. Результатом цієї мутації є те, що DAla-D-Ala змінюється на D-Ala-D-Lac, який важко зв'язується ванкоміцином [3].

До препаратів, спрямованих на рибосоми, бактерії можуть виробити резистентність через рибосомальні мутації. Аміноглікозиди запобігають синтезу бактеріальних білків, індукуючи неправильне зчитування кодонів і блокуючи транслокацію комплексів між тРНК і мРНК, взаємодіючи безпосередньо з 30SpРНК. Механізм резистентності до аміноглікозидів включає мутацію в субодиноці 30S. Рибосомальні субодиноці також можуть бути метильовані.

Наприклад, оксазолідинонові антибіотики (лінезолід) відіграють певну роль, зв'язуючись із 23S рРНК 50S рибосомальної субодиниці, стримують утворення вихідного комплексу та призводять до зупинки біосинтезу білка. Метилювання A2503 на гені 23S рРНК може призвести до стійкості до лінезоліду, хлорамфеніколу та кліндаміцину. Крім того, рибосомальний захист представляє інший тип механізму резистентності. Тетрациклін спочатку націлений на субодиницю рибосоми 30S, щоб пригнічувати синтез білка. Тим не менш, MRSA розвиває резистентність через протеїн захисту рибосом (RPP), залучаючи ген *erm*. Ці механізми перешкоджають здатності ліків зв'язуватися з рибосомою [3].

Для препаратів, спрямованих на синтез нуклеїнових кислот, таких як фторхінолони, вони втрачають свою антибактеріальну активність у результаті подвійних серинових мутацій ДНК-гірази та топоізомерази IV у резистентних до препаратів штаммах. Стійкість MRSA до фторхінолонів, таких як левофлоксацин, є прогресуючою: спочатку відбувається мутація топоізомерази IV, а потім мутація ДНК-гірази. Для препаратів, які пригнічують метаболічний шлях, ферменти, задіяні в шляху синтезу фолієвої кислоти (дигідропротеринсинтаза, дигідрофолатредуктаза), зазнають мутацій в активному центрі або поблизу активного центру та/або надмірно експресують стійкі до ліків ферменти. Зміни можуть перешкоджати зв'язуванню сульфаніламідів з дигідропротеринсинтазою та триметоприму з дигідрофолатредуктазою, але все ще дозволяють зв'язувати природні субстрати [1,3].

Зміна статусу бактеріальної колонізації

Внутрішньоклітинне виживання та утворення біоплівки також відповідають за лікарську резистентність MRSA, що захищає MRSA від імунної відповіді господаря та антибіотиків, а також ускладнює ефективне та повне лікування. MRSA є типовою факультативною внутрішньоклітинною бактерією, яка може виживати в альвеолярних макрофагах. Цьому сприяють фактори самосекреції, такі як фібронектинзв'язуючий білок А (FnBP А), зв'язуючий білок В (FnBP В) і ТК з метою адгезії та колонізації в хазяїні. Потім він проникає через клітинні мембрани та вторгається в клітини під дією b-токсину та d-токсину, і

починає паразитарне життя у фагосомах і цитоплазмі. Виживання та проліферація MRSA в клітинах досягається за допомогою таких факторів, як фенолрозчинний модульін а (PSMA), який перешкоджає поєднанню фагосом і лізосом, руйнує аутофагію та виходить із фагосом. Після зараження формуються варіанти малих колоній (SCV) MRSA, і цей стан тривалого носіння створює основу для хронічних і рецидивуючих інфекцій. Через зменшення секреції токсинів і прозапальних факторів його важко виявити та подолати природною імунною системою господаря та ліками [3].

Порівняно з планктонним MRSA утворення біоплівки демонструє вищу вірулентність і стійкість. Для патогенних організмів утворення біоплівки захищає бактерії від нападу імунної системи хазяїна та забезпечує захист від антимікробних агентів. Товста і липка матриця біоплівки ускладнює доступ антибактеріальних агентів до бактерій, оскільки матриця біоплівки містить білки, полісахариди та позаклітинну ДНК (ЕДНК), утворену в результаті автолізу мікробних субпопуляцій у резидентних бактеріях. Вищезазначені речовини покривають біоплівку і називаються позаклітинними полімерними речовинами (ЕПС). Бактеріальні клітини в біоплівках часто сидять з повільним метаболізмом і повільним поділом клітин, тому антибактеріальні агенти, які спрямовані на порушення росту та поділу бактеріальних клітин, мають незначний ефект. Важливим зауваженням щодо біоплівок є те, що близькість бактеріальних клітин сприятиме горизонтальному переносу генів. Це означає, що цим бактеріальним спільнотам може бути легше ділитися генами протимікробної стійкості [3].

Багато антибіотиків не мають здатності проникати через клітинні мембрани та бактеріальні біоплівки (β-лактами та аміноглікозидами), а час утримання в клітинах короткий (фторхінолони та макроліди), що призводить до недостатнього внутрішнього розподілу та низької концентрації [3].

В таблиця 3.1. показано узагальнені механізми резистентності MRSA до відомих антибіотиків.

Оскільки України є аграрною країною з розвиненим комплексом тваринництва, в першу чергу варто розглядати тварин, як основних переносників

MRSA. Штами цих патогенів дуже поширені по всьому світу і не виключено, що більшість з них присутні в Україні [71].

Таблиця 3.1.

Механізми дії та резистентності MRSA найважливіших класів антибіотиків [71]

Клас антибіотиків	Механізми дії	Механізми резистентності
Пеніциліни	Пригнічення біосинтезу клітинної стінки.	Вироблення β -лактамаз; РВР змінено; ефлюксні насоси.
Цефалоспорини		
Аміноглікозиди	Пригнічення синтезу білка шляхом зв'язування з 30S рибосомальною субодиницею.	ефлюксні насоси; модифікація мішені (рибосоми).
Макроліди		
Лінкозаміди	Пригнічення синтезу білка шляхом зв'язування з 30S рибосомальною субодиницею.	Модифікація мішені (рибосоми).
Хінолони	Пригнічення синтезу ДНК.	Модифікація мішені (ДНК-гіраза та ДНК-топоізомераза).
Тетрацикліни	Пригнічення синтезу білка на рівні елонгації пептиду.	Ефлюксні насоси; модифікація мішені (рибосоми).
Феніколи.	Інгібування реакції пептидилтрансферази в 50S рибосомній субодиниці.	ефлюксні насоси; модифікація мішені (фермент і рибосома).
Сульфаніламід	Пригнічення синтезу фолієвої кислоти.	Модифікація мішені (ферменти).

Таблиця 3.2.

Короткий опис переваг і недоліків різних класів препаратів, які застосовуються для лікування інфекцій MRSA [72]

Клас антибіотиків (з прикладами)	Переваги	Недоліки
не- β -лактамні антибіотики (триметоприм-сульфаметоксазол і доксициклін)	Випускається для перорального та парентерального застосування Хороша переносимість Ціна терапії Широкий спектр дії	Рівні опору Інфузію необхідно вводити у великому об'ємі рідини

Тетрацикліни/ гліцилцикліни (доксциклін, тайгециклін)	Широкий спектр дії	Доксициклін: рівні резистентності Тайгециклін: тільки внутрішньовенно, сильна нудота та блювота (побічний ефект, що обмежує дозу)
Нові похідні тетрацикліну (еравациклін, омадациклін)	Широкий спектр дії	Сильна нудота та блювота (побічний ефект, що обмежує дозу) Тільки парентерально Експресія резистентності/гени резистентності, що передаються горизонтально
Глікопептиди (ванкомицин, тейкопланін)	Золотий стандарт MRSA-терапії Доступні численні клінічні дані щодо його використання. Ціна терапії. Широкий діапазон показань	Збільшення МІК Тільки парентерально Необхідний терапевтичний лікарський моніторинг (через нефротоксичність та ототоксичність) Вираз резистентності (VISA, VRSA)
Ліпоглікопептиди (телаванцин, далбаванцин, оритаванцин)	Довгий період напіввиведення (однодозова терапія) Немає необхідності в терапевтичному лікарському моніторингу Широкий спектр дії	Тільки парентерально Ціна терапії Не можна видалити за допомогою діалізу Підвищена смертність при нирковій недостатності Експресія резистентності/гени резистентності, що передаються горизонтально
Оксазолідинони (лінезолід, тедізолід)	Випускається для перорального та парентерального застосування	Взаємодія між ліками Серотоніновий синдром Ціна терапії Експресія резистентності/гени резистентності, що передаються горизонтально
Ліпопептиди (даптоміцин)	Інфекції кровотоку, інфекційний ендокардиту	Тільки парентерально Експресія резистентності/гени резистентності, що передаються горизонтально

Цефалоспорины 5-го покоління (цефтаролін, цефтобіпрол)	Хороша переносимість Лікування бактеріємії	Ціна терапії Гідролізується деякими інфекціями Експресія резистентності/гени резистентності, що передаються горизонтально
Старіші фторхінолони (ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин)	Доступні для перорального та парентерального застосування Доступні численні клінічні дані щодо їх застосування. Хороша переносимість Накопичення у внутрішньоклітинному просторі Ціна терапії Широкий спектр дії	Профіль побічних ефектів (особливо в світлі останніх подій) Рівні резистентності та швидкий розвиток резистентності
Фторхінолони нового покоління (делафлоксацин; аварофлоксацин, фінафлоксацин, заборфлоксацин, немоноксацин)	Доступні для перорального та парентерального застосування. Широкий спектр дії Накопичення у внутрішньоклітинному просторі	Профіль побічних ефектів
Мупіроцин	Ціна терапії Дозозалежна Бактерицидна активність Місцевий засіб для деколонізації носа MRSA	Розвиток резистентності Ризик токсичності при пероральному/парентеральному застосуванні

У таблиці 3.2 наведено доступні на сьогодні препарати для терапії MRSA-інфекцій. Після появи MRSA в клінічній практиці значення не- β -лактамних антибіотиків (зокрема, триметоприм-сульфаметоксазолу і доксицикліну). Проте набута резистентність до вищезазначених препаратів розвивалася швидко. Наприкінці 1980-х років штами MRSA з резистентністю до всіх інших препаратів, крім ванкоміцину, були дуже поширеними [72].

Резистентність до не- β -лактамних антибіотиків може виникнути через альтернативні метаболічні шляхи синтезу фолієвої кислоти (через точкові мутації в гені *dhfr*), тоді як різні ефлюксні насоси *tet* та модифікація мішені (30S рибосомальна РНК) впливають переважно на доксициклін. Стійкість до фторхінолонів також часто виникає в MRSA і зумовлена мутаціями в області, що визначає резистентність до хінолонів ДНК-гірази (*gyrA* і *gyrB*) і топоізомерази IV (*grlA* і *grlB* у *S. aureus*). Крім того, надлишкова експресія ефлюксних насосів *NorA* та *NorB* групи основних фасилітаторів сприяє високому рівню резистентності до фторхінолонів (не кажучи вже про стійкість до кількох антисептиків і дезінфікуючих засобів) у *S. aureus* [72].

Враховуючи аналіз даних з табл.3.2. більша частина препаратів, якими лікують MRSA призводять до резистентності наявних штамів. Тому, пошук нових препаратів є нагальною потребою. Використання пеніцилону С може стати одним з рішень питання лікування MRSA. Він має високу антимікробну активність проти MRSA, звичайних штамів *S. aureus*, проти штамів, що мають та не мають резистентність до ванкоміцину [5].

MRSA може викликати цілий ряд органоспецифічних інфекцій, найпоширенішими з яких є шкіра та підшкірні тканини, за якими слідують інвазивні інфекції, такі як остеомієліт, менінгіт, пневмонія, абсцес легені та емпієма. Інфекційний ендокардит, спричинений MRSA, асоціюється з підвищеною захворюваністю та смертністю порівняно з будь-яким іншим організмом і пов'язаний із внутрішньовенним вживанням наркотиків [73].

Інфекції шкіри та м'яких тканин: MRSA є переважаючим мікроорганізмом, пов'язаним із цими захворюваннями, такими як целюліт, некротичний фасціїт та діабетичні виразки стопи. Це також все більше асоціюється з більш інвазивними захворюваннями, ніж ті, що викликані не-MRSA. Частіше ці інфекції є мультирезистентними, що призводить до частих рецидивів, збільшення госпіталізації та смертності [73].

Інфекції кісток і суглобів: стафілококи є найпоширенішою причиною інфекцій кісток і суглобів. Резистентність до оксациліну стає все більш

поширеною серед цих пацієнтів. MRSA може викликати остеомієліт хребта, довгих кісток верхніх і нижніх кінцівок шляхом поширення місцевої інфекції з рани або в складі гематогенної інфекції. Подібним чином MRSA може викликати септичний артрит як рідних, так і протезних суглобів [73].

Пневмонія: стафілококова пневмонія, історично відома як постгрипозна пневмонія, була окремою клінічною формою з різким початком респіраторних симптомів і смертністю від 80% до 90% в еру до антибіотиків. Вона мала специфічні рентгенологічні ознаки, включаючи порожнинні ураження, емпієму та піопневмоторакс, а також патологічні ознаки, такі як легенева кровотеча та утворення мікроабсцесу. У період після прийому антибіотиків перебіг був менш вибуховим, не завжди пов'язаним з вірусним грипом, пов'язаним з іншими факторами ризику інфекцій *S. aureus*, і спричиняє смертність приблизно від 30% до 40%. Незважаючи на це, нещодавно в Сполучених Штатах повідомлялося про MRSA, що спричиняє небезпечну для життя некротизуючу пневмонію у здорових людей. Характеризується важкими респіраторними симптомами, високою температурою, кровохарканням і гіпотензією. Він швидко прогресує до сепсису та септичного шоку з лейкопенією та підвищенням С-реактивного білка (більше 350 мг/дл). Багаточасткові порожнисті альвеолярні інфільтрати в таких клінічних умовах відповідають інфекції MRSA [73].

MRSA також є основною причиною внутрішньолікарняної пневмонії та пневмонії, пов'язаної з штучною вентиляцією легень. Внутрішньолікарняна пневмонія, або нозокоміальна пневмонія, характеризується як пневмонія, що розвивається через 48 годин або більше після госпіталізації, що вказує на те, що вона не була інкубаційною на момент госпіталізації. Вентилятор-асоційована пневмонія визначається як пневмонія, що розвивається через 48 годин або більше після виконання ендотрахеальної інтубації та механічної вентиляції легень і не була наявна до інтубації [73].

Бактеріємія. Повідомлялося, що бактеріємія, спричинена *S. aureus*, пов'язана зі смертністю від 15% до 60%. Бактеріємія MRSA зазвичай спостерігається у пацієнтів відділень інтенсивної терапії з вставкою центральної

лінії. Інфекційний ендокардит асоціюється з бактеріємією MRSA, і його слід виключити у будь-якого пацієнта з MRSA в крові. Результати, пов'язані з бактеріємією MRSA, гірші, ніж при інших інфекціях MRSA, через зниження відповіді на ванкоміцин у цих пацієнтів [73].

Ендокардит: MRSA є важливою причиною бактеріального ендокардиту, який може спричинити смерть приблизно у третини інфікованих пацієнтів (30-37%). Правобічний ендокардит MRSA зазвичай асоціюється з внутрішньовенним вживанням наркотиків і внутрішньовенними катетерами. Пацієнти з вегетацією трикуспідального клапана можуть мати септичну легеневу емболію, що спричиняє вузлуваті інфільтрати та кавітуючі ураження в легенях. Пацієнти можуть мати вторинні інфекції у віддалених вогнищах, таких як кістки та суглоби, нирки, мозок та інші органи. Важливо зібрати анамнез і провести ретельне обстеження цих пацієнтів у поєднанні з необхідними лабораторними та радіологічними тестами [73].

Остеомієліт – це запалення кістки, спричинене інфекцією. Воно може розвиватися після відкритих травм, операційних ускладнень, ураження м'яких тканин та бактеріальних захворювань. При ранній діагностиці остеомієліт добре піддається лікуванню, але якщо момент упустити він може поширитися на суміжні органи, призвести до розвитку абсцесу, некрозу та інших ускладнень [74].

Остеомієліт може вражати будь-які ділянки кісткової системи. Найчастіше хвороба розвивається у кістках [74]:

- щелепи;
- ніг;
- рук;
- тазу.

За статистикою, остеомієліт стегнової, малогомілкової та великогомілкової кісток, а також стопи займає до 63% випадків захворювання. Від 12 до 18% займає остеомієліт кісток рук. Також поширене ураження щелеп внаслідок карієсу, періодонтиту, видалення зуба тощо. Інші локалізації трапляються досить рідко [74].

При остеомієліті призначають комплексну терапію, яка може містити як консервативні, так й хірургічні методи. Її програма залежить від тяжкості

захворювання та загального стану пацієнта. Багатьом потрібна госпіталізація та цілодобове медичне спостереження [74].

При остеомієліті важливу роль відіграє антибактеріальна терапія. Як правило, вона проводиться високими дозами препаратів протягом 4-6 тижнів, інколи й більше. Якщо пацієнт добре реагує на лікування, за кілька тижнів його можуть виписати з клініки для продовження лікування у домашніх умовах. При хронічній патології пацієнтам також проводять тривалу антибіотикотерапію і призначають регулярні обстеження для контролю стану в динаміці [74].

Для лікування остеомієліту використовують наступні антибіотики: ванкоміцин, триметопрім, міноциклін, левофлоксацин та оксацилін [75]. Пропонується розглянути ринок антибіотиків, який присутній в Україні, що можна використовувати при остеомієліті. Левофлоксацин недоречно розглядати, оскільки за даними табл.3.2. до нього вже є резистентність. Міноциклін – відноситься до нових тетрациклінів, а отже, за тою ж таблицею, до нього також може бути резистентність. Триметопрім відноситься до нових не- β -лактамних антибіотиків, до яких ще немає стійкості. Ванкоміцин ефективний проти MRSA, але штам може мутувати до VRSA. Оксацилін – відомий антибіотик, який дуже часто використовувався для лікування остеомієліту, наразі в Україні немає препаратів з цією діючою речовиною, яка раніше вироблялася Кормпорацією Артеріум [76].

Таблиця 3.3

Аналіз ринку антибіотиків для лікування остеомієліту

Назва	Виробник	Антибіотик	Ціна, грн	Джерело
Бі-септ-Фармак таблетки по 400 мг/80 мг №20	АТ «Фармак», Україна	Триметоприм, сульфаметоксазол	від 52,07 до 128,00 грн	[77]
Суметролім таблетки по 400 мг/80 мг №20 (10x2)	ЗАТ Фармацевтичний завод ЕГІС, Угорщина.		від 66,63 до 120,00 грн	[78]

Трисептол таблетки по 400 мг/80 мг №20 (10x2)	ПАТ «Лекхім- Харків», Україна	Триметоприм, сульфаметоксазол	від 50,10 до 59,70 грн	[79]
Бісептол суспензія ор. 200 мг/40 мг/5 мл по 80 мл у флак.	Фармацевтичний завод “ПОЛЬФАРМА” С.А., Польща		від 83,00 до 217,36 грн	[80]
Ванкоміцин- Фармекс ліофілізат для р-ну д/інф. по 1000 мг №1 у флак.	ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», Україна	Ванкоміцин	від 265,00 до 370,00 грн	[81]
Ванкоміцин-Віста ліофілізат для р-ну д/інф. по 1000 мг №1 у флак. скл.	Mistral Capital Management Ltd, Туреччина		від 160,05 до 490,10 грн	[82]

Отже, з табл.3.3. видно, що в Україні присутні 3 препарати, які ще можна застосовувати для лікування остеомієліту. З врахуванням того, що ванкоміцин також спричиняє стійкість, а триметоприм для кращого лікування рекомендують вводити у вигляді ін'єкцій, а не таблеток, є потреба у розробці нового препарату для лікування остеомієліту.

Щодо пеніцилону С, вже з'являються компанії, які пропонують його комерційну реалізацію, наприклад, ChemSpider, який належить Великобританії. Проте, на сайті не зазначається вартість речовини. Також, комерційну пропозицію можна зустріти на китайських сайтах, таких як ChemicalBook та MOLBASE без зазначення вартості [83-85]. Це може казати про те, що наразі сировина не має високого попиту, а також доволі багато коштує, через що маркетплейси не вказують кінцеву ціну. Також, це каже про доволі низьку конкретність, а тому можна казати, що є сенс розробляти новий препарат для подальшої реалізації на теренах України.

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі пеніцилону С

Остеомієліт — це інфекційне захворювання кісток, яке може бути як гострим, так і хронічним. Це запальний процес, що залучає кістку та її структури.

Запальний процес вторинний по відношенню до інфікування бактеріями (у тому числі мікобактеріями), які поширюються з потоком крові, грибами, при переломах чи оперативному втручанні [86].

Успіх лікування остеомієліту, особливо у випадках, пов'язаних з імплантатами, залежить від великої хірургічної обробки та ефективної антибактеріальної терапії [86].

Тривалість антибактеріальної терапії варіює від 4 тижнів до 6 міс, і лікування має бути скориговано на основі результатів бактеріального посіву крові. Враховуючи, що проникнення антибіотиків у кістку дуже низьке (співвідношення концентрації в кістковій тканині до плазми для більшості антибіотиків максимум 0,3), переважає внутрішньовенна антибіотикотерапія (табл. 3.1). Внутрішньовенна антибіотикотерапія сприяє досягненню максимально можливих концентрацій у плазмі крові антибіотиків та подальшого проникнення в тканини та кістку [86].

Таблиця 3.4.

Приклади лікування остеомієліту різними лікарськими формами [86]

Інфекційний агент	Внутрішньовенна антибіотикотерапія	Пероральна антибіотикотерапія
Метицилінчутливий <i>Staphylococcus aureus</i> , метицилінчутливі коагулазонегативні стафілококи	цефазолін 2 г кожні 8 год; альтернативні схеми: кліндаміцин 600 мг кожні 6 год або 900 мг кожні 8 год; ванкоміцин 15 мг/кг маси тіла кожні 12 год (доза повинна бути скоригована для	Доксициклін 100 мг кожні 12 год; кліндаміцин 450 мг кожні 6 год; рифаміцин 600 мг всередину щоденно або 300–450 мг кожні 12 год; левофлоксацин 750 мг кожні 24 год або
Метицилінчутливий <i>Staphylococcus aureus</i> , метицилінчутливі коагулазонегативні стафілококи	підтримки мінімального рівня 15–20 мкг/мл); тейкопланін 6–12 мг/кг маси тіла кожні 12 год 3 дози, потім 6–12 мг/кг маси тіла кожні 24 год); даптоміцин 6 мг/кг кожні 24 год; лінезолід 600 мг кожні 12 год	моксифлоксацин 400 мг кожні 24 год);

<i>Streptococcus</i> spp.	цефтріаксон 2 г кожні 24 год; ампіцилін 2 г кожні 4 год або 3 г кожні 6 год. Альтернативні схеми: кліндаміцин 600 мг кожні 6 год або 900 мг кожні 8 год; ванкоміцин 15 мг/кг маси тіла кожні 12 год (доза повинна бути скоригована для підтримки мінімального рівня 15–20 мкг/мл); тейкопланін 6–12 мг/кг маси тіла кожні 12 год 3 дози, потім 6–12 мг/кг маси тіла кожні 24 год; даптоміцин 6 мг/кг маси тіла кожні 24 год; лінезолід 600 мг кожні 12 год	Амоксицилін 500 мг кожні 8 год; кліндаміцин 450 мг кожні 6 год; левофлоксацин 750 мг кожні 24 год або моксифлоксацин 400 мг кожні 24 год
Кишкові грамнегативні палички	Ципрофлоксацин 400 мг кожні 12 год; меропенем 1 г кожні 8 год або ертапенем 1 г кожні 24 год; піперацилін/тазобактам 4,5 г кожні 8 год;	Ципрофлоксацин 500–700 мг кожні 12 год
Множинна лікарська стійкість <i>Pseudomonas</i> spp.	Цефтазидим 2 г кожні 8 год; цефепім 2 г кожні 8 год; піперацилін/тазобактам 4,5 г кожні 6 год; ципрофлоксацин 400 мг кожні 8 год; меропенем 1 г кожні 8 год	Ципрофлоксацин 750 мг кожні 12 год

Грамнегативні бактерії	Фосфоміцин 12–24 г/добу, розділені на 3 прийоми; гентаміцин 5–7 мг/кг маси тіла кожні 24 год або амікацин 15 мг/кг маси тіла кожні 24 год; колістин 9 МО навантажувальна доза, потім на 4,5 МО кожні 12 год; тигециклін 100 мг ударна доза, потім по 50 мг кожні 12 год; цефтазидим/авібактам 2,5 г кожні 8 год	немає
<i>Anaerobes</i>	Амоксицилін/клавуланат 2,2 г кожні 8 або 6 год; піперацилін/тазобактам 4,5 г кожні 8 год; кліндаміцин 600 мг кожні 6 год або 900 мг кожні 8 год; метронідазол 500 мг кожні 8 год	немає

Тож, з таблиці 3.4. видно, що остеомієліт переважно лікують саме ін'єкційними препаратами. Тому, пропонується виготовляти саме препарати ін'єкційного призначення.

Лікарські форми для ін'єкцій - стерильні лікарські форми для парентерального застосування у вигляді розчинів, суспензій, емульсій, а також твердих лікарських речовин (порошки, таблетки, пористі маси), які розчиняють у стерильному розчиннику безпосередньо перед введенням [87].

Розрізняють ін'єкції малого об'єму (до 100 мл) і великого об'єму (100 мл і більше - інфузії). Порошок для ін'єкцій - стерильні тверді лікарські засоби, що застосовуються для приготування розчинів або суспензій для ін'єкцій. Розчини для ін'єкцій - стерильні водні або неводні розчини лікарських речовин у

відповідному розчиннику. Суспензії для ін'єкцій - стерильні високодисперсні суспензії. Емульсії для ін'єкцій - стерильні високодисперсні емульсії [87].

Розчин для ін'єкцій - це рідка лікарська форма для парентерального введення (минаючи шлунково-кишковий тракт). Розчини для ін'єкцій вводять підшкірно (п/к), внутрішньом'язово (в/м), внутрішньовенно (в/в). Лікарські форми для ін'єкцій - промислового виробництва: ампули, флакони, шприц-тюбики. Лікарські форми для ін'єкцій повинні бути стерильними, стійкими, апірогенними, вільними від механічних домішок [87].

Переваги ін'єкційного введення ліків [88]:

- Швидкість дії (в деяких випадках дія лікарського препарату розвивається через кілька секунд).
- Найбільш повна біологічна доступність (лікарські речовини вводяться, минувши такі захисні бар'єри організму, як шлунково-кишковий тракт).
- Точність і зручність дозування лікарських речовин.
- Можливість введення лікарських препаратів пацієнтам, які перебувають в несвідомому стані, при порушенні акту ковтання.
- Можливість вводити лікарські засоби, що руйнуються в шлунково-кишковому тракті: інсулін, строфантин, бензилпеніцилін.

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки пеніцилону С

Пеніцилін С можна виготовити у вигляді порошку для приготування ін'єкцій, у вигляді готового ін'єкційного розчину в ампулі або у вигляді готового шприц-тюбика, який є готовим до застосування лікарським препаратом.

Зазвичай порошки постачаються в скляних або пластикових контейнерах для однієї дози (нині менш рекомендований ПВХ або поліолефін). До переваг порошків як лікарської форми можна віднести наступні [89]:

- простота приготування, точність дозування;

- універсальність складу (у формі порошків можна поєднувати різні за складом і властивостям лікарські речовини);
- зручність зберігання і транспортування.

Недоліки порошків [89]:

- погана збереження у зв'язку з великою питомою поверхнею (легко втрачають або поглинають воду, окислюються тощо);
- потребують додаткової закупівлі не лише шприца, а й розчину для ін'єкцій.

Скляні ампули знайшли широке застосування для упаковки ін'єкційних ліків. Скло має важливі характеристики, які дозволяють широко використовувати його у виготовленні рецепієнтів для ліків та інших стерильних речовин. Ампульні рідкі препарати є дуже зручним лікарським засобом, оскільки це вже готова рідина для ін'єкції, яка потребує лише шприца, як додаткового знаряддя [89].

Для вибору форми випуску пеніцилону С маємо враховувати його розчинність. Він нерозчинний у воді, а лише в спиртових основах, які можуть випаровуватись при неналежному транспортуванні готових ін'єкційних розчинів. У цьому плані зберігання порошкової форми має більш практичне значення. Також, варто зазначити, що готові ампули з розчином стерилізуються, а як відомо, спирт доволі вибохонебезпечна рідина, тому, як форму пропонується випускати флакони з готовим порошком пеніцилону С, який легко простерилізувати.



Рис.3.1. Приклад випускової форми лікарського препарату [90]

Вторинна упаковка буде представлена пластиком вкладишем, який буде тримати флакони з порошком та буде жорсткою основою для нормального транспортування, щоб зберегти скло до кінцевої точки прибуття, а також картонною коробкою, яка буде на собі містити загальну інформацію щодо

препарату: назву, форму випуску, дозування діючої речовини, серія, термін зберігання та способу застосування із застереженням умов зберігання.

3.3. Вибір біологічного агента

Золотистий стафілокок (*S. aureus*) — грампозитивна бактерія скупченої сферичної форми. Це в першу чергу патоген людини і тварин. За даними досліджень, 20% осіб є постійними носіями *S. aureus*, а 30% – періодичними. Як наслідок, *S. aureus* є однією з основних причин поширення госпітальних та позалікарняних інфекцій, що призводить до серйозних наслідків та небезпечних для життя захворювань. Відкриття антибіотиків допомогло лікувати інфекційні захворювання, викликані *S. aureus* [91].

Проте, після винайдення пеніциліну пройшло 2 роки, як з'явився стійкий штам до нього. На противагу було розроблено метицилін, але через 10 років після його впровадження стали з'являтися метицилін-резистентні штами (MRSA), які є важкою проблемою і до сьогодні. MRSA стійкий до багатьох антибіотиків, таких як метицилін, пеніцилін, оксацилін, клоксацилін, цефазолін, цефокситин та інших поширених антимікробних речовин [91]. Тому, пропонується розглянути речовини мікроміцетних морських грибів, які також можуть протистояти цим патогенам.

P. janthinellum НК1-6 був виділено з мангрового ґрунту (біля морського берегу) на острові Хайнань у вересні 2015. Даний біологічний агент синтезує низку антимікробних речовин (пеніцилонів), які мають високу антимікробну активність як проти MRSA штамів так і проти звичайних стафілококів, а також ентерококів та кишкової палички [5].

Антимікробні речовини *A. fumigatus* AF3- 093A мають високу антимікробну активність проти MRSA, а також проти *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Даний біологічний агент було виділено з мікроводоростей Шетландських островів [92].

Penicillium sp. M30 було ізольовано на в'єтнамському острові Ко То з морського дна на глибині 14 м. Даний штам характеризується великою кількістю антимікробних речовин, які мають антагоністичні властивості, як проти

грампозитивних, так і проти грамнегативних бактерій, а також дріжджів [93].
Порівняння продуцентів показано в табл.3.5.

Порівняння морських мікроміцетів, що продукують антимікробні речовини проти метил-резистентного стафілококу

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація речовини, мг/л	МІК, мкг/мл	Література
<i>A. fumigatus</i> AF3- 093A*	Солодовий екстракт – 20, Пептон - 3	Світлове культивування, 25 °С, 14 днів, 150 об/хв	Флавіпін – 2,6	100	[92]
			Хетоглобозин А – 3,8	50	
			Хетоглобозин В – 3,8	200	
<i>P. janthinellum</i> НК1-6	Глюкоза – 20, Морська сіль – 30, Замість води – картопляний відвар (200 г картоплі на 1 л води)	25 °С, 28 днів, статичні умови	Пеніцилон А – 2,37	>50	[5]
			Пеніцилон В – 0,22	3,13	
			Пеніцилон С – 0,88	6,25	
			Пеніцилон D – 0,15	6,25	
			Пеніцилон Е – 0,12	>50	
<i>Penicillium</i> sp. M30	Морська сіль – 30 Крохмаль - 10, Дріжджовий екстракт - 4, Пептон - 2, СаСО ₃ - 1, FeSO ₄ – 0,04, КВrO ₃ – 0,1.	25 °С, 7 днів, 200 об/хв	3-ацетил-4-гідроксицинолін – 0,032	258	[93]
			1Н-індол-3-оцтова кислота – 0,082	128	

Примітка: *- МІК було перераховано з μM на мкг/мл враховуючи молекулярну масу флавіпіну – 196,16 г/моль та хетоглобозину А та В – 528,6 г/моль.

Найкращі результати щодо інгібування показують речовини *A. fumigatus* AF3- 093A (хетоглобозин А) та *P. janthinellum* НК1-6 (пеніцилолони В-Д). Проте, для кожного продуцента використовуються різні середовища, а тому доволі важко порівняти зазначені речовини, не знаючи їх умовної вартості. Для визначення цього показнику потрібно знати ціну поживного середовища. Для *P. janthinellum* НК1-6 також маємо врахувати, що використовується не вода, а картопляний відвар. Розрахунок поживних середовищ показано в табл.3.6.

Таблиця 3.6

Розрахунок поживних середовищ для культивування морських мікроміцетів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело
<i>A. fumigatus</i> AF3- 093A	Солодовий екстракт - 20	90	1,8	1
	Пептон - 3	1059	3,18	2
	Вартість 1 л поживного середовища ≈ 4,88 грн			
<i>P. janthinellum</i> НК1-6	Глюкоза – 20	30	0,6	3
	Морська сіль – 30	11,5	0,35	4
	Картопля - 200	5	1	5
	Вартість 1 л поживного середовища ≈ 1,95 грн			
<i>Penicillium</i> sp. M30	Морська сіль – 30	11,5	0,35	4
	Крохмаль - 10	25	0,25	6
	Дріжджовий екстракт - 4	1100	4,4	7
	Пептон - 2	1059	2,12	2
	CaCO ₃ - 1	20	0,02	8
	FeSO ₄ – 0,04	30	0,0012	9
	KBrO ₃ – 0,1	320	0,032	10
	Вартість 1 л поживного середовища ≈ 7,17 грн			

Примітка (ціни наведено станом на грудень 2023 року): 1 - <https://prom.ua/ua/p1267150491-solodovyj-ekstrakt.html>, 2 - <https://flagma.ua/pepton-fermentativniy-o13622945.html>, 3 - <https://prom.ua/p144210781-glyukoza-pishevayamagnij-okismetionin.html>, 4 - https://prom.ua/p1650457652-sol-pishevaya-morskaya.html?token=v2%3Apyslxfwfl-2knu8uRnx71WNTDPax4wFapeGXvG9yBfV6NZgfVm-zCHyMbc1l1DkLrGsVCxjMfi-mH0GADsyxzRkSQNUeCDo_Hsdcb9RSL5F_7LgS4&campaign_id=3518444&product_id=1650457652&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=ru&category_ids=23006&primelead=MC44NQ&from_spa=true, 5 - <https://flagma.ua/uk/kartoplia-optom-24t-o13623480.html>, 6 - <https://flagma.ua/uk/krohmal-ekstra-o13772510.html>, 7 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 8 - <https://prom.ua/p1098533283-karbonat-kaltsiya-tonkodispersnyj.html>, 9 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>, 10 - <https://flagma.ua/kaliy-bromnovatokisly-kaliy-bromat-hch-o11743811.html>

Найдешевше середовище притаманне *P. janthinellum* НК1-6 і коштує всього 1,95 грн, найдорожче у *Penicillium* sp. М30. Маючи зазначені дані, можна прорахувати вартість кожної речовини, яку потенційно можна використати в боротьбі проти MRSA. Визначення умовної вартості, а також швидкості утворення антимікробних речовин вказано в табл.3.7.

Таблиця 3.7

**Визначення умовної вартості та швидкості утворення аналогів
антибіотиків проти MRSA**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація речовин, мг/л	Умовна вартість 1 мг речовини, грн/мг	Тривалість синтезу, год	Кількість утвореної речовини за годину, мг/год
<i>A. fumigatus</i> AF3- 093A	4,88	Флавіпін – 2,6	1,88	336	0,0077
		Хетоглобозин А – 3,8	1,28		0,0113
		Хетоглобозин В – 3,8	1,28		0,0113
<i>P. janthinellum</i> НК1-6	1,95	Пеніцилон А – 2,37	0,83	672	0,0035
		Пеніцилон В – 0,22	8,86		0,0003
		Пеніцилон С – 0,88	2,22		0,0013
		Пеніцилон D – 0,15	13		0,0002
		Пеніцилон Е – 0,12	16,25		0,0002
		Пеніцилон F – 0,08	24,38		0,0001
<i>Penicillium</i> sp. М30	7,17	3-ацетил-4-гідроксицинолін – 0,032	224,06	168	0,0002
		1Н-індол-3-оцтова кислота – 0,082	87,47		0,0005

З таблиці 3.7 очевидна нерентабельність використання речовин *Penicillium* sp. М30. Вони дуже дорогі, а також повільно утворюються. Хетоглобозин А є найактивнішою субстанцією *A. fumigatus* AF3- 093A, його значення МІК щодо MRSA подібне до Пеніцилону А, який є дешевшим. Найменша МІК притаманна Пеніцилону В (3,13 мкг/мл), який має далеко не найвищу вартість, трошки більше значення МІК притаманні для Пеніцилону С та D (6,25 мкг/мл). Пеніцилон С дешевший за Пеніцилон В майже в 4 рази, а значення МІК відрізняється лише в 2 рази. Тому, Пеніцилон С вигідніше обрати за його умовною вартістю. Через це, обираємо *P. janthinellum* НК1-6 для одержання Пеніцилону С.

3.4. Розрахунок потреби у пеніцилоні С для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості пеніцилону С

Кількість випадків остеомієліту на рік в світі становить від 2 до 5 випадків на 10 000 населення. Тобто, в середньому 3,5 випадків на 10 000 населення [94].

Оскільки остеомієліт розвивається після поранень різного характеру та переломів, пропонується за основу взяти населення Дніпропетровської області, яке наразі чи не щодня знаходиться під постійними обстрілами. Кількість людей у цьому регіоні станом на 2023 рік чітко невідома, через війну, тому беремо до уваги дані за 2022 рік, які становили 3 093 151 осіб [95]. Отже, кількість випадків на населення:

$$\frac{3\,093\,151 \times 3,5}{10\,000} \approx 1083 \text{ випадків}$$

Остеомієліт стегнової, малогомілкової та великогомілкової кісток, а також стопи припадає до 63% випадків захворювання [74]. Отже, кількість цих видів захворювання на рік в Дніпропетровській області становить:

$$1083 \times 0,63 \approx 683 \text{ випадок}$$

Кількість випадків, які припадають на MRSA становить 17% [96]. Отже, кількість випадків, що викликає саме MRSA становить:

$$683 \times 0,17 \approx 117 \text{ випадків}$$

За основу пропонується взяти антибіотик оксацилін, який ще використовується в деяких країнах світу для лікування цього захворювання, а також за тієї причини, що пеніцилон С було порівняно саме з ним [5]. Тривалість лікування, як було вказано вище, триває 4-6 тижнів (5 в середньому). При цьому, на 1 день припадає доза в 2 г (поділена на 4 прийоми в 500 мг) [97]. Для подальшого розрахунку враховуємо МІК оксациліну проти MRSA, який становить 256 мкг/мл [98]. Для пеніцилону С цей показник становить 6,25 мкг/мл [5]. Отже, складаємо пропорцію та можемо дізнатись добову норму пеніцилону С:

$$256 \text{ мкг/мл} - 2 \text{ г}$$

$$6,25 \text{ мкг/мл} - x$$

$$\frac{6,25 \times 2}{256} = 0,0488 \text{ г або } 48,8 \text{ мг}$$

Тоді, з врахуванням того, що прийом препарату йде внутрішньовенно 4 рази на день (кожні 6 годин), одна доза становить:

$$\frac{48,8}{4} = 12,2 \text{ мг}$$

Один курс триває 5 тижнів, тоді, кількість пеніцилону С для 1 людини становить:

$$5 \times 7 \times 48,8 = 1708 \text{ мг}$$

Для забезпечення потреб Дніпропетровської області ця кількість має становити:

$$117 \times 1708 = 199\,836 \text{ мг}$$

Проте, зважаючи на конкуренцію, ми не можемо забезпечити абсолютно весь регіон. Тому, пропонується забезпечити 10% від загальної кількості. Тоді, річна потреба становить:

$$199\,836 \text{ мг} \times 0,1 = 19\,983,6 \text{ мг}$$

В культуральній рідині синтезується близько 0,88 мг/л пеніцилону С [5]. Отже, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{19\,983,6}{0,88} \approx 22\,708,6 \text{ л} \approx 22,71 \text{ м}^3$$

З врахуванням втрат при виділенні та очищенні, яка становить близько 30%, ця кількість буде становити:

$$\frac{22,71}{1 - 0,3} \approx 32,4 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 32,4 м³ культуральної рідини необхідно 300 робочих трудовнів (T_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 32,4 / 300 \approx 108 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V_{крц}):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 108 \cdot 679 / 24 \approx 3361 \text{ л},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 672 год (28 діб), та вивантаження – 0,5 год, і становить 679 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Оскільки гриби роду *Penicillium* є аеробами [99], то коефіцієнт заповнення ферментеру має становити 0,6. Тоді, об'єм ферментеру:

$$3361/0,6=5601,7 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є ферментер на 6 м³. Перевірочний коефіцієнт заповнення:

$$3361/6000=0,56, \text{ що знаходиться у межах норми ферментеру з аерацією}$$

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Пеніцилони – це антимікробні пігменти які виділяються поза клітину як частина її захисту від навколишніх чинників. Пеніцилон С є натуральним продуктом, що міститься в *P. janthinellum*, *P. ianthinellum* і *P. simplicissimum*, за наявними даними. Хімічна формула: C₂₉H₃₅ClO₇ [100].

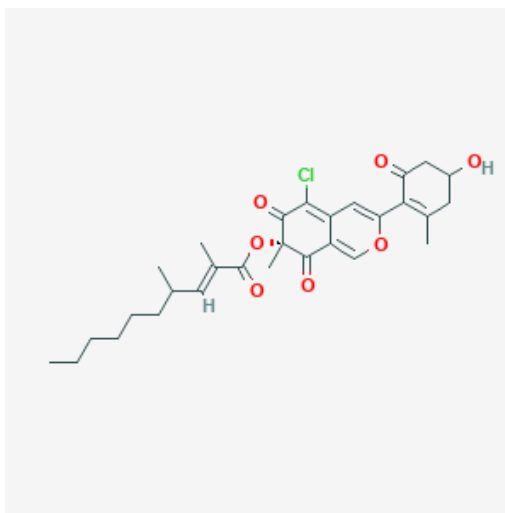


Рис.4.1. Хімічна структурна формула пеніцилону С [100]

Молекулярна маса: 531 г/моль. За формою може бути у вигляді жовтої олії або порошку жовтого кольору [5,100].

Точка кипіння: 582,7±50,0 °С [101].

Точка спалаху: 306.2±30,1 °С [101].

Щільність: 1,3±0,1 г/см³ [101].

Пеніцилони показали сильну анти-MRSA (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, ATCC 33591) активність (МІК = 3,13 до 6,25 мкг/мл). Чим цікавлять сучасних дослідників і до нині [5].

З врахуванням того, що пеніцилони є екзометаболітами, першою стадією виділення та очищення безсумнівно буде відокремлення супернатанту від біомаси. Біомаса для подальшої нашої роботи непотрібна, а тому буде передаватись на утилізацію. Тому, на цій стадіях варто розглянути методики

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.	Айсіна А.В.				РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ					
Перевір.	Резніченко Ю.М.							Літ.	Арк.	Архувів
Реценз.									67	118
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.									

одержання надосаду, до яких входить седиментація, фільтрування, центрифугування, флоакуляція та інші методи [102].

Оскільки ці пігменти наразі одержуються шляхом афінної хроматографії [5], який дуже дорого та важко реалізувати в промислових умовах, альтернативою є процеси екстракції. Тому, для заощадження реагентів варто передбачити стадію концентрування, яка дозволить зменшити не лише об'єм надосаду, а й розчинів, які будуть витратитись на його екстракцію. Тоді, наступною стадією варто виділити саме концентрування. Найпопулярнішими методами є ультрафільтрація, екстракція та випарювання у вакуум-випарному апараті [102].

Наступною стадією, як вже зазначалось, є екстракція пігментів. Ці стадії можна умовно розділити на 3 етапи: екстракція етилацетатом (він зв'язується з різними гідрофільними групами, що пояснює, чому пеніцилони нерозчинні у воді, цей розчинник не повністю видаляє усі зайві метаболіти, що потребує подальшої очистки), екстракція метанолом (метанол працює за принципом полярності, він притягує до себе полярні речовини, такі як пеніцилони, але в розчині їх одразу декілька), екстракція розчином хлороформу та метанолу (цей розчин відокремлює певну частину пеніцилонів та залишає у екстракті з метанолом лише пеніцилон А та С). Оскільки інших альтернатив немає, а отримати пеніцилон С необхідно, вважаємо наступний етап – екстракція різними розчинами для одержання суміші пеніцилонів А та С [5].

Наступний етап – це відокремлення пеніцилону С від пеніцилону А. Оскільки вони знаходяться у спиртовому розчині, їх важко відокремити методом кип'ятіння, оскільки пеніцилон А не такий термостабільний і у менш вибухових розчинах міг би просто зруйнуватись. При цьому, молекулярна маса пеніцилонів відрізняється одна від одної, пеніцилон С має більшу молекулу за пеніцилон А, тому в цьому випадку можна використати установку ультрафільтрації для відокремлення великих молекул від малих, з подальшим відмиванням фільтрів та одержанням пеніцилону С. Тому, наступна стадія – це відокремлення пеніцилону С від А [5,100,103].

Останнім етапом потрібно передбачити сушіння пеніцилону С. У цьому випадку необхідно розглянути низку методів орієнтуючись на характеристику та межі термостабільності зазначеного барвника. Тому, заключна стадія це сушіння барвника для одержання порошкової форми.

4.1. Обґрунтування методу відділення супернатанту від біомаси

Розділення культуральної рідини на тверду і рідку фази вимагає великих витрат, оскільки пов'язана з переробкою великих об'ємів суспензій. Для інтенсифікації цієї стадії і зниження втрат цільового продукту культуральну рідину перед розділенням фаз, як правило, піддають спеціальній обробці. В результаті змінюється структура осаду, що забезпечує максимальний ступінь переходу продукту в ту фазу, з якої його далі виділяють, а також видалення домішок, які ускладнюють виділення цільового продукту. Залежно від вимог до повноти відділення дисперсної фази і особливостей культуральної рідини для розділення використовують процеси фільтрації, центрифугування, сепарації, рідше флотації [102].

Під фільтруванням розуміють розділення твердої та рідкої фаз під час перепускання суспензії крізь пористу перегородку (фільтр). Його основним недоліком є забивання самого фільтру, що сповільнює сам процес фільтрування, а також додає додаткову роботу у вигляді промивання та регенерації фільтра, тому даний метод нам не підходить [102].

Центрифугування – це процес розділення рідких неоднорідних систем у полі дії відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій на рідину й тверді фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти й інші продукти біосинтезу кристалічної або аморфної структур [102].

Центрифуги використовують в таких випадках [102]:

- коли осад погано фільтрується;
- коли треба одержати біомасу, вільну від допоміжних фільтрувальних матеріалів;
- коли процес вимагає безперервності в умовах високої стерильності.

Істотний недолік центрифуг – негативна дія на клітини відцентрової сили та їх перегрівання. Проте для нас важливі не клітини, а супернатант, що робить центрифугу ідеальним варіантом для одержання пеніцилону С [102].

Флотація - спосіб концентрування суспензій і виділення біомаси застосовують у виробництві кормових дріжджів. Він полягає в тому, що отриману на стадії біосинтезу культуральну рідину спінюють, і при цьому велика частина дріжджів концентрується в пінній фракції. Дана методика не підходить для нашого виробництва, оскільки притаманна для відокремлення біомаси [102].

А тому, спираючись на все вищенаведене пропонується обрати саме центрифугування як основний метод відокремлення супернатанту від біомаси.

4.2. Обґрунтування концентрування супернатанту

Найчастішими методами концентрування можна поправу назвати вакуумне випаровування, а також концентрування через ультрафільтрацію. Перша методика непогана, але через великий об'єм супернатанту потребує дуже габаритного обладнання, що буде збільшувати робочу площу заводу, це головний недолік. Ультрафільтраційна установка дозволяє зконцентрувати великий об'єм рідини, при цьому не використовуючи велику площу, але недоліком буде необхідність регенерації та промивання фільтрів. Оскільки остання установка займає менше місця, пропонується обрати саме її, щоб зменшити робочу площу виробництва пеніцилону С [102].

4.3. Обґрунтування розчинів для екстракції пеніцилону

Рідинна екстракція–процес вилучення одного або кількох компонентів з розчинів (реакційних мас) за допомогою селективних розчинників (екстрагентів). У процесі взаємодії з екстрагентом у ньому добре розчиняються лише ті компоненти, що вилучаються і значно слабше або зовсім не розчиняються інші компоненти. Отже, при екстракції відбувається не тільки вилучення цільової речовини, але й її очищення. В результаті екстракції одержують екстракт – розчин вилученої речовини і рафінат – відпрацьований вихідний розчин [104].

Отже, з основної статті можна зробити висновок, що пеніцилони щонайменше розчинні у метанолі [5].

Етилацетат - це естер, який утворює водневі зв'язки з гідрофільними групами. Це пояснює, чому пеніцилони нерозчинні у воді. Однак етилацетат не повністю очищує пеніцилон С від домішок, оскільки в екстракті є багато води. Тому для подальшої очистки необхідно використовувати інші методи [104].

Етилацетат також є ефективним для екстракції частково розчинних у воді естерів. Це пояснюється відсутністю самоасоціації та екрануванням алкільними замісниками атомів оксигену та подвійних зв'язків [104].

Ураховуючи відсутність додаткової інформації, пропонується залишити етилацетат для екстрагування супернатанту. Перед цим супернатант необхідно попередньо зконцентрувати для заощадження екстрагентів [104].

Спирти як екстрагенти поступаються кетонам у здатності концентрувати барвники. Це пояснюється їхньою здатністю до самоасоціації, яка зменшує ймовірність утворення водневих зв'язків з молекулою барвника. Найширшого застосування набули ізопропіловий та ізобутиловий спирти. Екстракційна активність спиртів залежить насамперед від їхньої полярності. Наприклад, ізопропіловий спирт практично повністю вилучає харчові барвники [104].

Метанол є найбільш часто використовуваним екстракційним розчинником через свою високу полярність. Порівняно з етанолом, метанол має нижчу температуру кипіння, вищу летючість і вищу ефективність екстракції [104].

Хлороформ з метанолом виступає додатковим розчинником, який знімає частину аналогічних речовин до пеніцилону С, але при цьому не впливає на нього. Він розчиняє інші пеніцилони (крім С та А), та відокремлює їх екстракцією, що дозволяє зменшити подальшу кількість стадій для одержання пеніцилону С [5].

Враховуючи відсутність іншої інформації щодо можливої екстракції пеніцилону С, а також наявність подібної інформації щодо екстрагентів в інших роботах з цим пігментом, пропонується залишити розчинники незмінними. Отже, рекомендується використовувати етилацетат для екстракції супернатанту, метанол для вилучення полярних речовин, а саме пігментів, а також екстрагування зайвих пеніцилонів хлороформом з метанолом [5].

4.4. Обґрунтування методу відокремлення пеніцилону С від пеніцилону А

Як було вказано раніше, пеніцилон А не такий термостабільний, як пеніцилон С, але ж вони знаходяться у спиртовому метанольному розчині, і з врахуванням температури кипіння пеніцилону А, метанол просто вибухне, що є дуже небажаною реакцією [101,103].

Ще одним можливим методом може стати ультрафільтрація, оскільки цей метод передбачає розділення великих та малих молекул через фільтр. Проблемою цього методу є те, що пеніцилон С буде залишатись на фільтрі, а фільтр потрібно буде промивати вручну метанольним розчином (метанол в концентрації 80%) для відокремлення запропонованого пігменту. Оскільки більше немає можливих варіантів відокремлення цих двох пігментів один від одного, пропонується обрати ультрафільтраційне відділення пеніцилону С з подальшим промиванням фільтрів метанольним розчином з метою одержання бажаного пігменту [5,100,103,104].

4.5. Обґрунтування методу одержання пеніцилону С

Пеніцилон С – термостабільний барвник [5], проте, звичайне сушіння не є гарним варіантом через малий об'єм самого пеніцилону. Для цього ліпше використати кристалізацію в метанолі, що дозволить кінцево відокремити наш продукт та одержати його суху форму. Кристалізацію будемо проводити шляхом випарювання, оскільки пеніцилон С доволі термостабільний. Далі, маємо порошок щонайменше подрібнити та просіяти. Для одержання нормальної фракції порошку.

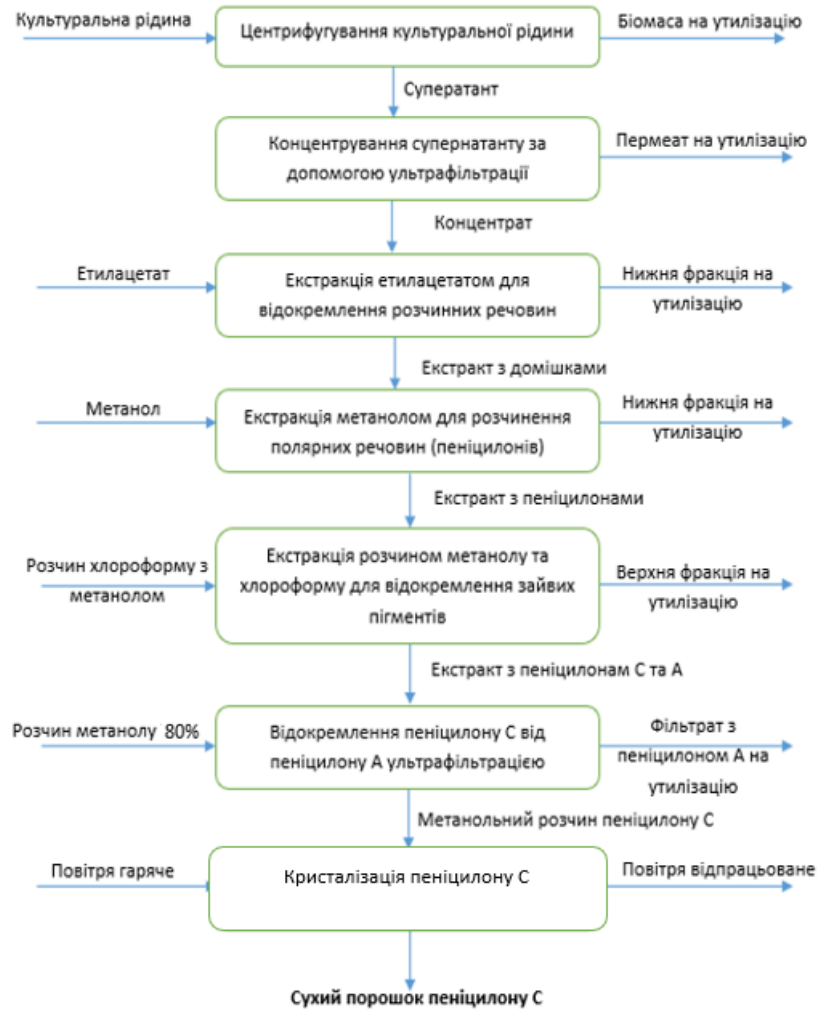


Рис.4.2. Схема виділення та очищення пеніцилону С

РОЗДІЛ 5

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 3361 л;
2. Концентрація біомаси *P. janthinellum* НК1-6 в культуральній рідині чітко не відомо. Тому її варто розрахувати. За літературними даними відомо, що грибна біомаса складається на 38-57% з карбону (усереднено 47,5%) та на 0,23-15% з азоту (усереднено 7,6%) [105]. Оскільки конкретної інформації щодо біохімічного складу грибів роду *Penicillium* немає, будемо орієнтуватись на усереднені значення. Склад поживного середовища для культивування зазначеного продуцента є наступним (г/л) [5]:

Глюкоза – 20,

Морська сіль – 30,

Замість води – картопляний відвар (200 г картоплі на 1 л води)

Оскільки немає інформації стосовно кількості карбону та нітрогену, що знаходиться в картопляному відварі, будемо орієнтуватись на кількість карбону та нітрогену, що знаходиться в картоплі. Картопля містить 30,57% карбону та 23,31% азоту [106]. Але варто зазначити, що максимум речовин, яку може віддати картопля в бульйон складає близько 60% [107].

Глюкоза та картопляний відвар є основним джерелом карбону для біомаси *P. janthinellum* НК1-6. Відомо, що на 180 г глюкози припадає 72 г карбону (в перерахунку на молекулярну масу). Отже, на 20 г припадає $20 \times 72 / 180 = 8$ г карбону. На 1 л середовища припадає 200 г картоплі, отже, кількість карбону з картоплі становить $200 \times 0,3057 \approx 61,1$ г. З врахуванням того, що картопля максимально може виділити лише 60% всіх речовин, кількість карбону у відварі становитиме $61,1 \times 0,6 \approx 36,7$ г карбону. Варто зазначити, що

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Айсина А.В.				РОЗДІЛ 5 ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Резніченко Ю.М.						74	118
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

половина вуглецю піде на окиснення, отже, кількість карбону, що піде на конструктивний метаболізм становить $(8+36,7)/2 \approx 22,3$ г.

Для синтезу пеніцилону С також потрібен карбон, оскільки він має наступну хімічну формулу: $C_{29}H_{35}ClO_7$. На 531 г пеніцилону С припадає $29 \times 12 = 348$ г карбону [108]. Тожі, для синтезу 0,88 мг пеніцилону С кількість карбону становить $(0,88 \times 348000 / 531000) \approx 0,6$ мг. З врахуванням того, що на весь конструктивний метаболізм витрачається 22,3 г, дана кількість карбону ніяк не вплине на кінцеву концентрацію біомаси, а тому нею можна знехтувати.

Кількість карбону в грибній біомасі становить 47,5%. Отже, кількість біомаси за карбоном становитиме $22,3 / 0,475 \approx 46,9$ г.

Основним джерелом азоту виступає картопляний відвар. Отже, в 200 г картоплі знаходиться $200 \times 0,2331 \approx 46,6$ г. З них, максимально в середовище виділиться $46,6 \times 0,6 \approx 28$ г.

Кількість азоту в грибній масі становить 7,6%. Отже, кількість біомаси за азотом становитиме $28 / 0,076 \approx 368,4$ г.

Тож, основним лімітувальним фактором росту виступатиме карбон. Максимальний вихід біомаси ($C_{\text{біом}}$) = 46,9 г/л.

3. Концентрація пеніцилону С в культуральній рідині ($C_{\text{біом}}$) = 0,88 мг/л;

3. Втрати на стадіях виділення і очищення пеніцилону С = 30 %;

Початкова кількість пеніцилону С складає $0,88 \times 3361 \approx 2957,68$ мг, а кінцева його кількість, з урахуванням 30%-ів втрат, має становити 2070,38 мг. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 2.1.

Схема виділення була побудована на основі джерела [5]. На жаль, пеніцилон С та інші похідні цих речовин виділяються лише методом високоефективної рідинної хроматографії, що не підходить для промислового виділення. Тому, були використанні розчинники, для екстракції речовин, а також було визначено, що температура кипіння пеніцилону А (який знаходиться в кінцевому екстракті разом з пеніцилоном С) є нижчою, за пеніцилон С [108,109], через що відокремлення цих сполук можна здійснити звичайним кип'ятінням

[110,111]. Через термостійкість пеніцилону С його можна висушити в розпилюючій сушарці.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 30 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 4 Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	3361 л	-	3361 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 4 м ³
ТП 5 Центрифугування культуральної рідини						
2	Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	3361 л	-	-	Центрифуга проточного типу
		Біомаса	46,9 г/л	-	≈157,6 кг	На утилізацію
		Супернатант	-	-	≈3203 л	До збірника об'ємом 4 м ³
ТП 6 Концентрування супернатанту ультрафільтрацією						
3	Концентрування супернатанту ультрафільтрацією	Супернатант	3203 л			В ультрафільтраційній установці
		Концентрований супернатант (в 10 разів)	-	5%	304,3 л	В збірник об'ємом 1 м ³
ТП 7 Екстракція концентрованого супернатанту етилацетатом						
4	Екстракція концентрованого супернатанту етилацетатом	Концентрований супернатант	304,3 л	-	-	В збірнику об'ємом 1 м ³
		Етилацетат	456,5 (3 рази по 152,15 л)	-	-	
		Первинний екстракт (верхня фракція)	-	5%	433,7 л	
ТП 8 Екстракція пігменту метанолом						
5	Екстракція пігменту метанолом	Екстракт	433,7 л	-	-	В збірнику об'ємом 1 м ³
		80% метанол	216,9 л	-	-	
		Вторинний екстракт (верхня фракція)	-	5%	206,1 л	До збірника об'ємом 500 м ³

Закінчення табл.5.1

ТП 9 Екстракція розчином хлороформу з метанолом						
6	Екстракція розчином хлороформу з метанолом	Вторинний екстракт	206,1 л	-	-	В збірнику об'ємом 500 л
		Хлороформ	51,5 л	-	-	
		Метанол	51,5 л	-	-	
		Третинний екстракт (нижня фракція)	-	5%	97,9 л	До збірнику об'ємом 500 л
ТП 10 Розчинення пеніцилону А та С						
7	Розчинення пеніцилону А та С	Третинний екстракт	97,9 л	-	-	В збірнику об'ємом 500 л
		Метанол	293,7 л	-	-	
		Розчин пеніцилонів	-	-	391,6 л	
ТП 11 Відокремлення пеніцилону С від пеніцилону А						
8	Відокремлення пеніцилону С від пеніцилону А	Розчин пеніцилонів	391,6 л	-	-	В ультрафільтраційній установці
		Пермеат з пеніцилоном А	-	-	391,6 л	На утилізацію
		75-% розчин метанолу	80 л	-	-	-
		Розчин пеніцилону С	-	5%	76 л	В збірник на 100 л
ТП 12 Кристалізація пеніцилону С						
9	Кристалізація пеніцилону С	Розчин пеніцилону С	76 л	-	-	В конвективну сушарку
		Кристали пеніцилону С	-	4%	2091,17 мг	В скляний флакон на 5 мл
ТП 13 Подрібнення та просіювання пеніцилону С						
10	Подрібнення пеніцилону С	Кристали пеніцилону С	2092,17 мг	-	-	В подрібнювачі лабораторному
		Подрібнений пеніцилон С	-	1%	2070,38 мг	В скляний флакон на 5 мл

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ
ПЕНІЦИЛОНУ С

Специфікація апаратурного обладнання для одержання пеніцилону С показано в табл.6.1

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання виробництва пеніцилону С

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний повітряний фільтр для грубого очищення класу очистки G4. Середня утримуюча здатність синтетичного пилу (%) – 65-90. Фільтруючий матеріал – целюлоза. ¹
Ф-3	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Повітряний компактний фільтр тонкого очищення класу очистки F9. Справляється як з видаленням різних запахів, так і з видаленням хімічних й інших речовин з повітря. Складається з пластикової рамки і фільтруючого матеріалу (скловолокно). Середня утримуюча здатність синтетичного пилу (%) – 85-95. ²
Ф-4	НЕРА фільтр очистки повітря	1	НЕРА фільтр класу очистки H14. Матеріал для даного типу фільтрів являє собою гофрований фільтрувальний папір на основі ультра і мікротонкого скловолокна. Середня утримуюча здатність синтетичного пилу (%) – до 99,9995. ³
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник мідно-алюмінієвий двохранний. Корпус: оцинкований лист. Теплоносій: вода або незамерзальні суміші. ⁴
Ф-6 Ф-10	Фільтр піщаний для води	1	Піщаний фільтр PLS 0420. Швидкість фільтрування до 9 м ³ /год. Тип підключення: боковий. Матеріал корпусу: поліпропілен. ⁵
Ф-7	Вугільний фільтр для води	1	Вугільний фільтр Absolute. Продуктивність до 9 м ³ /год. Тип підключення: горизонтальний. Матеріал корпусу: поліпропілен. ⁶

<i>НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Айсіна А.В.</i>			
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>			
<i>Реценз.</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>			
РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПЕНІЦИЛОНУ С			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>
				<i>Аркушів</i>
				78 118
			Кафедра БТМ	

3-8 3-12	Збірник для пом'якшення води об'ємом 200 л Збірник для зберігання води знесоленої	1	Реактор на 200 л. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. Тиск у теплообмінній сорочці, бар + 5,0. ⁷
Н-9 Н-25 Н-28 Н-31 Н-35	Насос перистальтичний	5	Насос перистальтичний PTL17. Продуктивність від 129 до 908 л/год. Робочий тиск – до 4 бар. Робоча температура до 135 °С. ⁸
УФ-11	Установка зворотнього осмосу для знесолення води	1	Установка зворотнього осмосу OS-4 VendService. Продуктивність 170 л/год. Тип установки – підлоговий. ⁹
3-13	Збірник для приготування 80-% метанолу	1	Реактор на 400 л з робочим об'ємом 350 л. Тиск у корпусі, бар -1,0 - + 3,0. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹⁰
Д-14 Д-15 Д-23 Д-24 Д-27 Д-30 Д-33	Об'ємно-ваговий дозатор для рідин	7	Рідинний дозатор для дозування рідких компонентів. Дозування до 10000 л. Похибка дозування 1%. ¹¹
3-16 3-19	Збірник для зберігання культуральної рідини об'ємом 4 м ³ Збірник для зберігання супернатанту	2	Сталевий реактор об'ємом 4000 л. Тиск у корпусі, МПа 0,25-0,5. Швидкість мішалки – 180 об/хв. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹²
Н-17 Н-20	Відцентровий насос	1	Відцентровий насос Saer CB 40 PL, однофазний. Продуктивність 12 м ³ /год. Робочий тиск до 10 бар. Нержавіючий вар ротора. ¹³
Ц-18	Проточна центрифуга	1	Проточна центрифуга GF/GQ150. Продуктивність 800-1000 л/год. Швидкість ротора – до 16000 об/хв. ¹⁴
УФ-21	Ультрафільтраційна установка для концентрування	1	Установка ультрафільтрації з керамічної мембраною. Продуктивність – до 5000 л/год. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹⁵
3-22	Збірник для концентрованого супернатанту	1	Сталевий реактор об'ємом 1000 л. Тиск у корпусі, МПа 0,25-0,5. Швидкість мішалки – 180 об/хв. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹²

3-26 3-29	Збірник для екстракції хлороформом з метанолом Збірник для розчинення	2	Сталевий реактор об'ємом 500 л. Тиск у корпусі, МПа 0,25-0,5. Швидкість мішалки – 180 об/хв. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹²
УФ-32	Ультрафільтраційна установка для концентрування	1	Установка ультрафільтрації з керамічної мембраною. Продуктивність – до 500 л/год. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹⁵
3-30	Збірник для розчину пеніцилону С		Сталевий реактор об'ємом 100 л. Тиск у корпусі, МПа 0,25-0,5. Швидкість мішалки – 180 об/хв. Матеріал – нержавіюча сталь 316L AISI. ¹²
С-36	Сушарка конвективна для кристалізації	1	Сушильна шафа ІLMAX. Температура на вході – 50-300 °С, вихід – 30-150 °С. Ступінь вишушування ≥98 %. ¹⁶
П-37	Подрібнювач з ситом	1	Лабораторний подрібнювач ЛМТ-2 OLISLAB 2200 з ситом. Максимальний об'єм бункеру – 280 мл. Діаметр сита – 0,8 та 1,0 мм. ¹⁷

Примітка: 1 - <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>,
2 - <https://shop.alterair.ua/product/kompaktnyy-filtr-tonkoy-ochistki-f5-f9-eu5-eu9/>, 3 -
<https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/6364274/all/filtr-tonkogo-ochishchennya-povitrya-ftov-nera-hepa/>, 4 -
<https://alltan.com.ua/ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html>, 5 - <https://ge-ua.net/product/filtr-pishhanij-plastikovij-bokove-pidklyuchennya-ecostar/>, 6 - <https://prom.ua/ua/p421724412-post-ugolnyj-filtr.html>, 7 -
<https://promvit.com.ua/reaktor-smesitel-nominalnym-obemom-150-l-stal-aisi-316l-2/>, 8 -
<https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#tekhnichni-dani>, 9 - <https://prom.ua/ua/p185171345-ustanovka-obratnogo-osmosa.html>, 10 - <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-prigotovleniya-inekcionnyx-rastvorov-obem-700-l-rabochee-davlenie-v-korpuse-3-bar/>, 11 - <https://abvstroy.com.ua/ua/p404078789-kontroller-zhidkostnyj-dozator.html>, 12 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/500l-1600114654237.html>, 13 -
<https://santel.kiev.ua/uk/nasos-centrobezhnyj-saer-11-kvt-12-m3ch-4l-m-cb-40-pl-odnophaznyj.html>, 14 -
https://www.alibaba.com/product-detail/continuous-flow-centrifuge-_60021532084.html, 15 -
https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane_system/ustanovka-s-keramicheskoy-membranoy-mikrofiltracii-dlya-proizvodstva-belogo-vina/, 16 - https://ilmax.com.ua/product/sushilnye-shkafy-degidraty?gclid=CjwKCAiAzc2tBhA6EiwArv-i6T0MUH9jxafJAgvYDWU9uAORmU86ciycJeCRNZhzAqVFV0Mj3rlhzRoC4ssQAvD_BwE, 17 -
https://labormarket.com.ua/p76475506-laboratornaya-melnitsa-lmt.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=20115123075&utm_network=g&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=159596651881&utm_term=&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAzc2tBhA6EiwArv-i6cvrWfejO9KcQytXyICsxqkuhe3V4v9cRtnHqHN1-8PTar_f9CYkOhoC8H0QAvD_BwE

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ

Для виробництва пеніцилону С варто передбачити підготовку повітря для сушіння, підготовку води знесоленої та підготовки розчинів для екстракції. Воду знесолену варто використовувати для розбавлення метанолу, оскільки кінцевий продукт – це порошок для ін'єкцій.

ДР 1. Підготовка гарячого повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Через повітрязабірник (ПЗ-1) на висоті 10 м забирають атмосферне повітря, яке потрібно очистити від всіх забруднюючих частинок.

ДР 1.2. Очистка брудного повітря від грубих частинок

Для цього, брудне атмосферне повітря подають на фільтр грубої очистки (Ф-2) зі ступінню очищення 90%.

ДР 1.3. Очистка повітря у фільтрі тонкого очищення

Наступним етапом є наступне очищення повітря у фільтрі тонкої очистки (Ф-3) від ще більш дрібних частинок бруду, що може потрапити до порошку. Ступінь очистки цього фільтру становить 95%.

ДР 1.4. Кінцева очистка повітря у фільтрі

Оскільки препарат буде ін'єкційним, варто забезпечити надочищене повітря, в якому не буде міститися ні бруду, ні мікроорганізмів. Стадія здійснюється в НЕРА фільтрі (Ф-4) зі ступеню очищення 99,995%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря у теплообміннику

Повітря потрапляє до теплообміннику водного типу (Т-5), де воно нагрівається до температури 200 °С.

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Айсіна А.В.</i>			РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архувів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					81	118
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДР 2. Приготування води знесолоної

ДР 2.1. Механічна фільтрація

Очищення водопровідної води (100 л) від механічних домішок здійснюється на піщаних фільтрах (Ф-6), які забезпечують видалення більших частинок розміром 5 мкм.

ДР 2.2. Глибинна фільтрація

На цьому етапі вода очищається від механічних домішок розміром 1-3 мкм. Цей процес відбувається на вугільних фільтрах (Ф-7), які працюють паралельно або по черзі.

ДР 2.3. Пом'якшення води

Пом'якшення води здійснюється методом відстоювання. Іони кальцію та магнію перетворюються на важкорозчинні сполуки шляхом додавання у воду розрахункових кількостей гідрату оксиду кальцію – 20,4 г, каустичної соди – 13,2 г та кристалічного карбонату натрію – 150 г (З-8). Після трьох годин взаємодії накипоутворюючих сполук при 90 °С із зазначеними реагентами утворюються осади, які потім видаляють відстоюванням або фільтрацією. Для фільтрації використовується піщаний фільтр (Ф-10), до якого вода поступає за допомогою перистальтичного насоса (Н-9).

ДР 2.4. Зворотній осмос

Потім отриману воду пропускають через напівпроникну мембрану під впливом зовнішнього тиску. Робочий надлишковий тиск розчину солі значно перевищує осмотичний тиск. Зворотньо осмотична установка зазвичай складається з насоса високого тиску, пермеатора (мембранної установки) і блоку управління, що підтримує оптимальний режим роботи (УФ-11). Тривалість – 1 година. Одержана вода подається до збірника (З-12).

ДР 3. Приготування 80-% метанолу

До збірника (З-13) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-14) наливають 237,5 л метанолу. Після цього, за допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-15) доливають 59,4 л води знесолоної від ДР 2.4. Вміст збірника

перемішують при 50 об/хв протягом 10 хв. Концентрацію метанолу перевіряють ареометром.

ТП 4. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у З-16 при 4-8 °С. Періодично вміст збірника перемішують для уникнення осадження біомаси на низ апарату.

ТП 5. Центрифугування культуральної рідини

За допомогою відцентрового насосу (Н-17) культуральну рідину подають до проточної центрифуги (Ц-18). Швидкість ротора встановлюється на рівні 10000 об/хв, а тривалість – 3,5 години. Біомасу передають на утилізацію, а супернатант передається до збірника (З-19).

ТП 6. Концентрування супернатанту ультрафільтрацією

Зі збірника (З-19) до ультрафільтраційної установки (УФ-21) за допомогою відцентрового насосу (Н-20) до фільтрів подається супернатант. Ступінь концентрування рідини має становити 10 разів. Тривалість концентрування – 1 година. Пермеат знешкоджується, а концентрований супернатант передається до збірника (З-22).

ТП 7. Екстракція концентрованого супернатанту етилацетатом

До збірника (З-22) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-23) подається 152,15 л етилацетату. Розчин перемішують при 200 об/хв протягом 1 години. Після цього, розчин залишає в стані спокою протягом 2 годин. Після цього, нижню фракцію зливають, а фракцію, що залишилася, ще 2 рази піддають екстракції. Після цього, екстракт залишається в цьому ж самому збірнику.

ТП 8. Екстракція пігменту метанолом

До збірника (З-22) від ДР 3 за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-24) подають 216,9 л 80% метанолу. Розчин перемішують при 200 об/хв протягом 1 години. Після цього, розчин залишає в стані спокою протягом 2 годин. Після цього, нижню фракцію зливають, а верхню фракцію перекачують за допомогою перистальтичного насосу (Н-25) до збірника (З-26).

ТП 9. Екстракція розчином хлороформу з метанолом

До збірника (З-26) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-27) подають 51,5 л хлороформу та 51,5л метанолу. Розчин перемішують при 200 об/хв протягом 1 години. Після цього, розчин залишає в стані спокою протягом 2 годин. Після цього, нижню фракцію перекачують за допомогою перистальтичного насосу (Н-28) до збірника (З-29). Верхню фракцію передають на знешкодження.

ТП 10. Розчинення пеніцилону А та С До збірника (З-29) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-30) подають 293,7 л метанолу. Розчин перемішують при 200 об/хв протягом 1 години.

ТП 11. Відокремлення пеніцилону С від пеніцилону А

До ультрафільтраційної установки (УФ-32) за допомогою перистальтичного насосу (Н-31) подають розчин пеніцилонів С та А. Тривалість фільтрування близько 1 години. Після цього, до ультрафільтраційної установки (УФ-32) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-33) у зворотньому напрямку подають 80 л 80-% розчину метанолу зі збірника (З-13). Одержаний розчин пеніцилону С подають до збірника (З-34)

ТП 12. Кристалізація пеніцилону С

За допомогою перистальтичного насосу (Н-35) розчин пеніцилону С розливається на деко та подається до сушарки (С-36). До апарату подається повітря від ДР 1.5. Температура сушіння – 195 °С. Кристалізація препарату – 12 годин.

ТП 13. Подрібнення та просіювання пеніцилону С

Порошок подають до бункеру подрібнювача (П-37), та подрібнюють порошок до 0,8 мм. Вага - 2070,38 мг. Субстанцію переносять до скляного флакону на 5 мл.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ

8.1. Визначення жорсткості води знесоленої

Визначення жорсткості води зазвичай здійснюється за допомогою солемірів для води. Для зручного аналізу пропонується використовувати ручний солемір, наприклад, АКТ EZODO 7200. Він має точність вимірювання $\pm 2\%$. Діапазон визначення солей 0~1000 ppm, а показнику загальної кількості розчинених твердих речовин (TDS). Роздільна здатність - 1 ppm /0.01 ppt [112].



Рис.8.1. Солемір АКТ EZODO 7200 [112]

8.2. Визначення концентрації метанолу

Концентрація метанолу у відсотках відповідає його градусу, тому логічне використання ареометру, який визначає градус спирту. Механічні пристрої зовні схожі на градусник, усередині скляної трубки є шкала, внизу вміщено вантаж у вигляді ртуті чи дробинок. Електронний пристрій круглої або прямокутної форми оснащений датчиком-щупом для рідини. Для виробництва пропонується обрати механічний ареометр, оскільки він є дешевшим за його електронний аналог [113].

					НУХТ БТЕК 02.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Айсіна А.В.				РОЗДІЛ 8	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Резніченко Ю.М.				КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПЕНІЦИЛОНУ С ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ МЕТИЦИЛІН- РЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ	85	118	
Реценз.					Кафедра БТМ			
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							



Рис.8.2. Ареометр АСП-3 70-100 % [113]

8.3. Контроль рівню рідини

Рівень варто контролювати під час екстракції, оскільки рідини діляться на 2 фази. Для безперервного безконтактного вимірювання можна використовувати різні рівнеміри. Одним з гарних варіантів є радарні рівнеміри. Через антену датчика випромінюється безперервний радарний сигнал. Випромінювання відбивається від поверхні продукту і Приймається антеною як ехо-сигнал. Різниця частоту виучуваного і прийнятого сигналів пропорціональна відстань до поверхні середовища, тобто залежить від рівня Заповнення. Визначений таким чином рівень перетворюючи у відповідний вихідний сигнал і видається як вимірювані значення [114].

Для наших задач ідеально підійде радарний рівнемір Vegapuls 21. Точність вимірювання - ± 2 мм. Робочий тиск -1 ... +3 бар [114].



Рис.8.3. Радарний рівнемір VEGAPULS 21 [114]

8.4. Контроль ваги пеніцилону С

Для забезпечення потреб виробництва підійдуть лише аналітичні ваги з класом точності 1. Пропонується обрати ваги XA 5Y Radwag. Їх дискретність складає 0,00001 г. Також, до їх особливостей потрібно віднести те, що вони сенсорні [115].



Рис.1.4. Аналітичні ваги XA 5Y Radwag [115]

8.5. Контроль вологості пеніцилону С

Для того, щоб виробництво не збанкрутувало на аналізі, варто підібрати такий аналізатор вологості, який може визначити ступінь вологості і з малою масою зразку. До такого обладнання відноситься аналізатор вологості KERN DLB 160-3A. Його дискретність становить 0,001 г. Дискретність вмісту води - 0,01%. Нагрівання відбувається від лампи галогенової [116].



Рис.8.5. Аналізатор вологості KERN DLB 160-3A [116]

8.6. Контроль кольору пеніцилону С

Колір визначають візуально. Він має бути жовтого кольору [5].

8.7. Контроль антимікробної активності пеніцилону С

Антагоністичну активність визначали за допомогою 96 лункового планшету. Для цього 20 мкл розчину пеніцинолу С в концентрації 31,25 мкг/мл розподіляли в 96-лунковий планшет, і в кожен лунку інокулювали 80 мкл MRSA середньої логарифмічної фази, таким чином, що кінцева концентрація білку становила 6,25 мкг/мл. Після 24 годин інкубації при 37 °С ріст тестового організму оцінюють шляхом вимірювання оптичної густини OD_{490} . Як контроль, використовували культури кишкової палички без антимікробного пептиду. Ріст MRSA має бути відсутнім в лунках, де містився пеніцинол С [5]. Тобто, значення оптичної густини має бути нижчим у лунках з пеніцилоном С, ніж у лунках, де його немає.

Для даного аналізу зазвичай використовують мікропланшетний рідер. Для даного аналізу достатньо буде використання #9ISG019065090 UVM 340 рідера. Визначення довжини хвилі – 340-800 нм. Може читати 12-, 24-, 48- та 96-лункові планшети [117].

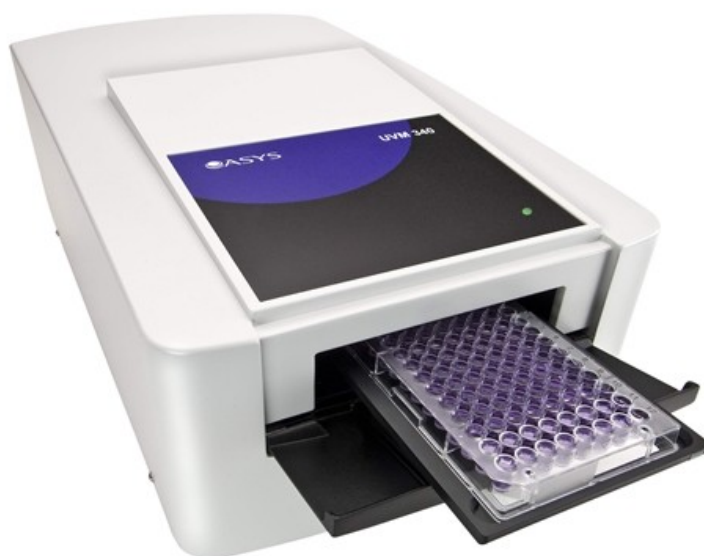


Рис.8.6. Мікропланшетний рідер #9ISG019065090 UVM 340 [117].

РОЗДІЛ 9

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОСТЕОМІЄЛІТУ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва препарату проти остеомієліту та кількості серій на рік

В рік виробляється 19983,6 мг пеніцилону С. На одну дозу припадає 12,2 мг. Отже, річна потужність складає:

$$\frac{19983,6}{12,2} \approx 1638 \text{ дози}$$

За один цикл одержується 2070,38 мг. Тоді, кількість препарату за серію складає:

$$\frac{2070,38}{12,2} \approx 170 \text{ доз}$$

Кількість серій на рік становитиме:

$$\frac{1638}{170} \approx 10 \text{ серій}$$

9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря

9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Клас чистоти приміщення для виробництва стерильних ін'єкційних порошків повинен бути А. Це найвищий клас чистоти, який забезпечує наявність у повітрі не більше 1 колонієутворюючих одиниць (КУО) мікроорганізмів на кубічний метр повітря [118].

Клас А необхідний для виробництва стерильних ін'єкційних порошків, оскільки ці препарати вводяться безпосередньо в кровотік і тому повинні бути абсолютно вільними від мікробних забруднень [118].

Для забезпечення класу А в приміщенні повинні бути встановлені такі

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Розроб.		Айсина А.В.			РОЗДІЛ 9 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОСТЕОМІЄЛІТУ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					89	118
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

системи [118]:

- Припливно-витяжна вентиляція з високою ефективністю фільтрації повітря.
- Контроль мікробного забруднення повітря за допомогою мікробіологічних досліджень.
- Система очищення повітря, яка включає в себе фільтрацію, іонізацію та ультрафіолетове опромінення.

Крім того, персонал, який працює в приміщенні класу А, повинен бути одягнений в чистий спецодяг, а всі операції повинні проводитися в асептичних умовах. Головний убір має повністю закривати волосся, а також бороду і вуса (при їх наявності); він має бути вставлений у комір костюма; необхідно на обличчі носити маску для запобігання поширенню крапельок. Слід носити відповідним чином простерилізовані та ненапудрені гумові або пластикові рукавички і простерилізовані або продезінфіковані бахіли. Нижні краї штанів мають бути вставлені в бахіли, а рукави одягу – у рукавички. Захисний одяг практично не має виділяти волокна або часточки і має затримувати часточки, що відокремлюються від тіла [118].

Вентиляційне повітря для класу чистоти А повинно бути максимально очищене від мікроорганізмів і інших забруднень. Для цього використовується система підготовки повітря, яка включає в себе такі етапи [118]:

1. Фільтрація

Перший етап підготовки повітря - це фільтрація, яка здійснюється за допомогою фільтрів різних типів. Для фільтрації повітря в класі чистоти А використовують фільтри HEPA (High Efficiency Particulate Air), які мають ефективність фільтрації не менше 99,995% для частинок розміром 0,3 мкм.

Фільтри HEPA встановлюються в кілька каскадів, щоб забезпечити максимальну ефективність фільтрації. Перший каскад фільтрів зазвичай складається з фільтрів грубої очистки, які затримують великі частинки пилу та інших забруднень. Другий каскад фільтрів складається з фільтрів тонкої очистки, які затримують дрібні частинки, включаючи мікроорганізми.

2. Очищення

Після фільтрації повітря може бути додатково очищено за допомогою таких методів [118]:

- Іонізація - це процес генерування іонів в повітрі. Іони мають бактерицидну дію і можуть знищувати мікроорганізми.
- Ультрафіолетове опромінення - це метод, при якому повітря опромінюється ультрафіолетовим світлом. Ультрафіолетове світло має бактерицидну дію і також може знищувати мікроорганізми.

3. Контроль якості

Якість очищеного повітря контролюється за допомогою мікробіологічних досліджень. У повітрі приміщення класу чистоти А не повинно бути більше 1 КУО мікроорганізмів на кубічний метр повітря [118].

Система підготовки повітря для класу чистоти А повинна бути проєктована та встановлена фахівцями, які мають досвід роботи в галузі виробництва стерильного обладнання. Система повинна забезпечувати ефективне очищення повітря і відповідати вимогам відповідних нормативних документів [118].

Основні вимоги до системи підготовки повітря для класу чистоти А [118]:

- Ефективність фільтрації повітря не менше 99,995% для частинок розміром 0,3 мкм.
- Використання фільтрів HEPA в кілька каскадів.
- Можливість додаткового очищення повітря за допомогою іонізації або ультрафіолетового опромінення.
- Контроль якості очищеного повітря за допомогою мікробіологічних досліджень.

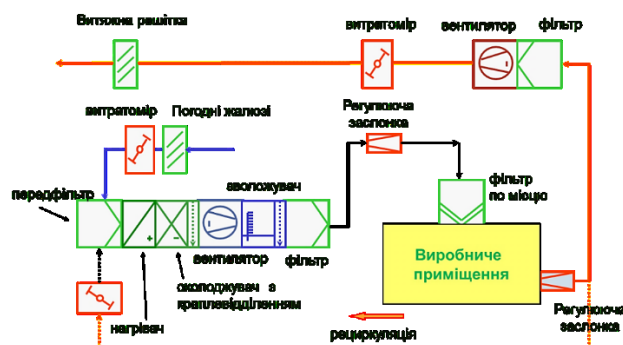


Рис.9.1. Схематичне зображення підготовки вентиляційного повітря [119]

На рис.9.1. показано узагальнену апаратурну схему для підготовки вентиляційного повітря для приміщень.

9.2.2. Підготовка персоналу

Персонал, який працює на фармацевтичному виробництві стерильних порошків для ін'єкцій, повинен пройти спеціальну підготовку, щоб мінімізувати ризик мікробного забруднення продукції. Ця підготовка включає в себе такі етапи [118,119]:

1. Медичний огляд

Перш ніж приступити до роботи на виробництві, персонал повинен пройти медичний огляд, щоб виключити наявність у нього захворювань, які можуть призвести до мікробного забруднення продукції.

2. Освіта

Персонал повинен пройти навчання з питань гігієни праці та асептики. Навчання включає в себе вивчення таких тем:

- Загальні принципи гігієни праці
- Асептика і антисептика
- Особливості виробництва стерильних порошків для ін'єкцій

3. Технічна підготовка

Персонал повинен пройти навчання з питань експлуатації обладнання та технології виробництва стерильних порошків для ін'єкцій. Навчання включає в себе вивчення таких тем:

- Будова і принцип роботи обладнання
- Технологічна схема виробництва
- Контроль якості продукції

4. Одягання спецодягу

Персонал, який працює на виробництві стерильних порошків для ін'єкцій, повинен одягатися в спеціальний одяг, який забезпечує захист від мікробного забруднення. Спецодяг включає в себе:

- Халат

- Маску
- Шапку
- Взуття

5. Процедура очищення рук

Перед початком роботи та після її закінчення персонал повинен проводити процедуру очищення рук. Процедура очищення рук включає в себе такі етапи:

- Вмивання рук з милом і водою протягом 2 хвилин
- Обробка рук спиртовим розчином

6. Дотримання правил поведінки

Персонал, який працює на виробництві стерильних порошків для ін'єкцій, повинен дотримуватися таких правил поведінки:

- Не вживати їжу, напої та тютюнові вироби на виробництві
- Не торкатися обличчя, волосся та одягу під час роботи
- Не носити на виробництві коштовні прикраси

7. Контроль дотримання правил підготовки персоналу

Контроль дотримання правил підготовки персоналу здійснюється за допомогою таких заходів:

- Контроль медичних оглядів
- Контроль знань персоналу
- Контроль дотримання правил одягу та поведінки

Основні вимоги до підготовки персоналу фармацевтичного виробництва стерильних порошків для ін'єкцій [118,119]:

- Персонал повинен бути здоровим і не мати захворювань, які можуть призвести до мікробного забруднення продукції.

- Персонал повинен бути навчений з питань гігієни праці та асептики.

- Персонал повинен бути ознайомлений з технологією виробництва стерильних порошків для ін'єкцій.

- Персонал повинен дотримуватися правил одягу та поведінки на виробництві.

9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Дезінфікуючі препарати — це хімічні речовини або біологічні засоби, які застосовуються для знищення або інактивації патогенних мікроорганізмів (бактерій, вірусів, грибків, найпростіших) на різних поверхнях, предметах, воді, повітрі [120].

Основні вимоги до дезінфекційних препаратів [120]:

- Ефективність — здатність препарату знищувати або інактивувати патогенні мікроорганізми.
- Безпека — відсутність токсичності та канцерогенності для людини та навколишнього середовища.
- Стійкість — здатність препарату зберігати свої властивості в процесі зберігання та застосування.
- Концентрація — вміст активної речовини в препараті.
- Спосіб застосування — способи та режими застосування препарату.

Дезінфікуючі препарати класифікуються за такими ознаками [120]:

- За хімічною природою:
 - Хлорвмісні (хлорамін, хлоргексидин, гіпохлорит натрію);
 - Альдегідні (формалін, глутаровий альдегід, перформ);
 - Перикисовмісні (перекис водню, озон);
 - Фенольні (фенол, лізол, хлорофіліпт);
 - Спиртові (етанол, ізопропіловий спирт);
 - Амідні (діоксан, амфолан);
 - Йодовмісні (йод, йодофори);
 - Катіонні поверхнево-активні речовини (ЧАС);
 - Нейтральні поверхнево-активні речовини.
- За механізмом дії:
 - Бактерицидні (знищують бактерії);
 - Віруліцидні (знищують віруси);
 - Фунгіцидні (знищують гриби);
 - Протозойоцидні (знищують найпростіших).

Для фармацевтичного виробництва стерильних порошків для ін'єкцій необхідно використовувати дезінфікуючі засоби, які мають високу ефективність і безпеку. Вони повинні бути здатні знищувати широкий спектр патогенних мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси, гриби та найпростіших. Крім того, дезінфікуючі засоби повинні бути стійкими до впливу навколишнього середовища та нешкідливими для людей та навколишнього середовища [120].

Згідно з вимогами належної виробничої практики (GMP), для дезінфекції приміщень, обладнання та сировини в фармацевтичному виробництві стерильних порошків для ін'єкцій рекомендується використовувати такі дезінфікуючі засоби [120]:

Хлорвмісні дезінфікуючі засоби, такі як хлорамін, хлоргексидин, гіпохлорит натрію. Вони мають широкий спектр антимікробної дії, є ефективними проти бактерій, вірусів, грибів та найпростіших. Однак хлорвмісні дезінфікуючі засоби можуть бути токсичними та канцерогенними, тому їх використання вимагає дотримання певних заходів безпеки.

Альдегідні дезінфікуючі засоби, такі як формалін, глутаровий альдегід, перформ. Вони також мають широкий спектр антимікробної дії, є ефективними проти бактерій, вірусів, грибів та найпростіших. Однак альдегідні дезінфікуючі засоби можуть бути токсичними та канцерогенними, як і хлорвмісні, тому їх використання вимагає дотримання певних заходів безпеки.

Перикесовмісні дезінфікуючі засоби, такі як перекис водню, озон. Вони мають високу ефективність проти бактерій, вірусів, грибів та найпростіших. Однак кисневомісні дезінфікуючі засоби можуть бути небезпечними при використанні в закритих приміщеннях, оскільки вони виділяють токсичні гази.

Спиртові дезінфікуючі засоби, такі як етанол, ізопропіловий спирт. Вони мають високу ефективність проти бактерій, вірусів та грибів. Однак спиртові дезінфікуючі засоби можуть бути небезпечними при використанні на чутливих поверхнях, таких як шкіра та слизові оболонки.

Пропонується розглянути 3 різні види дезінфікуючих засобів для

Порівняння препаратів для дезінфекції

Тип	Назва	Діюча речовина	Вартість за 1 л препарату, грн	Концентрація робочого розчину, %	Вартість за 1 л робочого розчину, грн	Джерело
Хлорвмісні	Chlorine Liquid	Гіпохлорит натрію	98,6	0,05	0,005	[121]
	Бланідас-Ц Гіпохлорит		72	0,1	0,007	[122]
	Новохлор-екстра		108	0,01	0,001	[123]
Альдегідні	Фамідез Форте	Формалін	545	0,5	0,273	[124]
	KENO CID 210	Глутаровий альдегід	460	0,5	0,23	[125]
	Екомент Форте		407	0,025	0,01	[126]
Перикисовмісні	Бланідас-А Оксі 35	Перекис водню	114	0,1	0,011	[127]
	Стабіцип СЕЕЦ		228	0,3	0,068	[128]
	СТ Sanitari Cleaner		470	5	2,035	[129]

запропонованого виробництва. Спиртові дезінфікуючі препарати не розглядаємо, оскільки знайти концентрат для більш економічного використання дуже важко, а більшість з препаратів на спиртовій основі коштують чималі гроші. Тому, будемо розглядати хлорвмісні, альдегідні та перекисовмісні препарати.

В табл.9.1. показано порівняння різних дезінфікуючих засобів. Для запропонованого виробництва треба обрати 3 препарати через те, що воно працює майже весь рік і щоб уникнути утворення резистентності мікроорганізмів з навколишнього середовища треба іноді змінювати дезінфікуючі препарати за діючою речовиною. Отже, найдешевшим хлорвмісним препаратом за ціною робочого розчину виявився Новохлор-екстра, з альдегідних - Екомент Форте, а з перекисовмісних - Бланідас-А Оксі 35. Через економічну вигідність залишаємо свій вибір саме на цих препаратах для дезінфекції.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Оскільки виробництво передбачає створення стерильного лікарського засобу, попередньо потрібно підготувати первинну упаковку, а саме скляні флакони. Для цього, попередньо їх миють, сушать, а потім стерилізують [129].

Миття флаконів

Флакони миються для того, щоб видалити з них всі забруднення, включаючи мікроорганізми, механічні частинки та інші домішки. Існує два основних способи миття флаконів: шприцевий та ультразвуковий [129].

Шприцевий спосіб полягає в тому, що флакони обробляються під тиском профільтрованою водою, парою або повітрям [129].

Ультразвуковий спосіб полягає в тому, що флакони занурюються у воду, в якій збуджуються ультразвукові коливання. Ці коливання сприяють розриву молекулярних зв'язків між забрудненнями та поверхнею флакона, що полегшує їх видалення [129].

Після миття флакони обполіскуються водою для ін'єкцій, профільтрованою через мембранний фільтр з порами розміром не більше 5 мкм [129].

Стерилізація флаконів

Стерилізація флаконів необхідна для знищення всіх мікроорганізмів, які могли залишитися на них після миття. Стерилізація флаконів здійснюється в сушильно-стерилізаційних установках тунельного типу. У цих установках флакони проходять три зони: нагрів до температури стерилізації, витримка при цій температурі протягом заданого часу і охолодження. Температура стерилізації в зоні повинна підтримуватися в межах 315 ± 35 °С, залежно від цього тривалість стерилізації складає від 5 до 30 хвилин [129].

Підготовка закупорювальних засобів

Підготовка закупорювальних засобів (пробок і ковпачків) також необхідна для забезпечення стерильності готової продукції. У промислових умовах для підготовки закупорювальних засобів використовується поліфункціональне устаткування з програмним управлінням, яке дозволяє здійснювати всі операції в одному апараті [129].

Початковою стадією підготовки закупорювальних засобів є перегляд і обробка пробок на відповідність вимогам НТД. Для перегляду закупорювальних засобів використовуються спеціальні закупорювальні столи, обладнані джерелом денного світла [129].

Миття пробок є важливим етапом виробництва лікарських препаратів. Цей процес дозволяє видалити з виробів усі забруднення, включаючи мікроорганізми, механічні частинки та інші домішки [129].

Миття пробок

Миття пробок здійснюється в кілька етапів [129]:

- Відмивання гумової крихти та інших механічних забруднень.
- Миття в розчині миючого засобу, шляхом кип'ятіння в розчині натра їдкого

Після миття пробки обполіскуються проточною водою, потім очищеною. Останнє обполіскування проводиться проточною водою для ін'єкцій,

профільтрованою через мембранний фільтр з порами розміром не більше 0,5 мкм [129].

Стерилізація пробок

Стерилізація пробок здійснюється в автоклаві обробкою насиченою парою у воді для ін'єкцій з подальшою сушкою стерильним гарячим повітрям [129].

9.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Як вже було вище зазначено, для запропонованого виробництва необхідна підготовка води очищеної та води для ін'єкцій. Оскільки вода для ін'єкцій виготовляється з води очищеної, це не буде проблемою.

Вода для ін'єкцій - це очищена вода, яка відповідає вимогам Державної фармакопеї України. Вона повинна бути вільною від мікроорганізмів, механічних домішок, органічних речовин і інших забруднень, які можуть бути шкідливими для здоров'я людини [118].

Виготовлення води для ін'єкцій здійснюється в кілька етапів [118]:

Очищення від механічних домішок. Водопровідна вода пропускається через фільтри, які видаляють з неї великі механічні домішки розміром більше 5 мкм.

Глибоке очищення. Вода проходить через вугільні фільтри, які видаляють з неї дрібні механічні домішки, а також органічні речовини, такі як хлор, феноли та інші.

Знезараження. Вода стерилізується різними методами, найпоширенішим з яких є теплова стерилізація під тиском. На даному етапі вода вважається водою очищеною.

Пілограмація. Вода пропускається через мембранний фільтр з порами розміром 0,22 мкм, щоб видалити з неї найдрібніші механічні домішки та інші забруднення.

Отримана вода відповідає вимогам Державної фармакопеї України і може використовуватися для виготовлення лікарських препаратів, які вводяться в організм людини внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно [118].

Для забезпечення високої якості води для ін'єкцій на всіх етапах її виробництва проводиться контроль якості. Контроль якості включає в себе [118]:

- Вивчення фізико-хімічних властивостей води (щільність, питома електропровідність, рН, вміст органічних речовин та інших забруднень).
- Бактеріологічне дослідження води.

9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Для початку, потрібно підготувати флакони та пробки. Для цього використовується устаткування, яке миє, суше та стерилізує зазначені компоненти лікарського препарату.

Флакони підготувати в сучасних реаліях легше, адже вони скляні і не потребують особливих умов стерилізації. Для підготовки цієї частини можна використати миєчно-стерилізуючий апарат FOWS, який виконує одразу 3 функції: миття, сушіння та стерилізація. Камери для цих технологічних процесів створені зі сталі нержавіючої AISI 316Ti. У камері розташовано 6 зондів RTD PT100 для постійного та негайного моніторингу циклів миття та стерилізації. Зонди розташовані в деяких критично важливих точках камери, наприклад, у проміжних просторах дверей та зливу води, щоб гарантовано забезпечувати рівномірність температури. Обладнання відповідає стандартам ISO 9001 та GMP [131].



Рис.9.2. Миєчно-стерилізуючий апарат FOWS [131]

Для гумових пробок раніше використовували комбінацію з декількох машин, але останнім часом з'являються апарати комбінованого типу навіть для таких важких матеріалів для стерилізації як гума. Компанія HUBER Systems розробила саме такий апарат, який дозволяє мити, сушити та стерилізувати гумові пробки. Апарат DS 50 S – це комбінація мийки, стерилізатора та сушарки для миття гумових пробок і гумових виробів фармацевтичної та технічної еластомерної промисловості. Обробка пластикових, гвинтових і алюмінієвих ковпачків. Об'єм завантаження апарату – до 50 л [132].



Рис.9.3. Комбінований апарат DS 50 S для миття, сушіння та стерилізації гумових пробок [132]

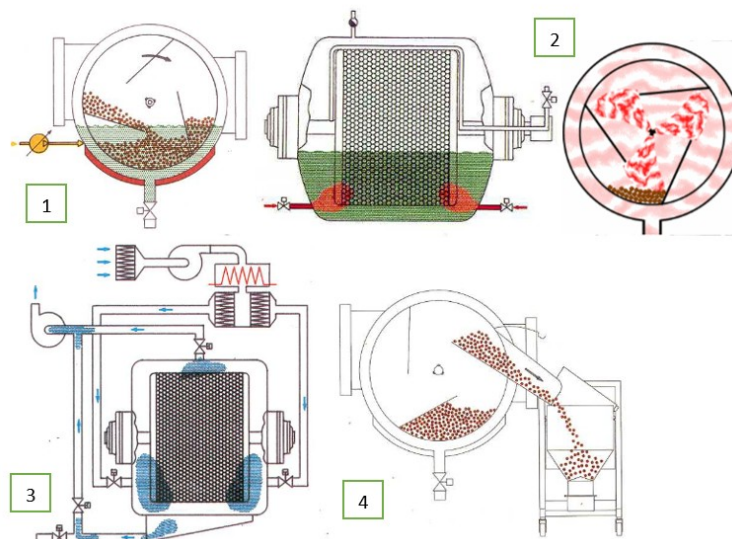


Рис.9.4. Стадії підготовки гумових пробок в DS 50 S: 1 – миття; 2 – стерилізація; 3 – сушіння; 4 – вивантаження стерильних та сухих гумових пробок [132]

На рис.9.4. показано послідовно стадії підготовки гумових пробок в DS 50 S.

Варто зазначити, що апарат DS 50 S на другій стадії пропонує 2 типи стерилізації. Перший – це субаквальна стерилізація (стерилізація у водяній бані), а другий – класична. Субаквальна попередня стерилізація служить для видалення сторонніх компонентів і для вивільнення речовин, які важко видалити, або хімічного забруднення з гумових пробок. Таким чином, прямий позитивний вплив на вимивання внутрішніх речовин пробок і, таким чином, на стабільність препарату. Дана стерилізація проходить у водяній бані під 125 °С [132].

Після цього, зайва вода видаляється, та починається стерилізація паром. Пар подається через форсунки центрального валу. Пара, що постійно і рівномірно подається через форсунки, гарантує оптимальний розподіл температури, і машина швидко досягає необхідної температури стерилізації 121 °С. Під час стерилізації пробки час від часу плавно зсуваються. Тиск і температура постійно реєструються [132].

Після стерилізації, гумові пробки висушують від зайвої вологи. Апарат обладнано додатковим модулем нагрівання повітря, а тому передбачити додаткове обладнання для нагріву повітря непотрібно [132].

Також, додатково варто передбачити підготовку самої субстанції, оскільки порошок має бути стерильним. Одержана субстанція у вигляді пеніцилону С є термостабільною, а тому її можна стерилізувати сухим жаром при 180 °С. Оскільки об'єм на серію дуже малий, тривалість стерилізації складатиме всього 30 хв. Для такої підготовки субстанції варто передбачити сухожар. Для потреб запропонованого виробництва можна використовувати сухожар MicroSTOP M1E. Максимальна робоча температура – 200 °С. Об'єм стерилізаційної камери - 2 л. Матеріал - сталь нержавіюча [133].



Рис.9.5. Сухожаровий апарат MicroSTOP M1E [133]

Після підготовчих процесів можна приступати до наповнення та закупорювання флаконів. Для цих цілей можна використати автоматичну лінію по наповненню та закупорюванню НХ-GX011. Максимальна швидкість – 40 флаконів/хв. Працює повністю в асептичних умовах. Робочий процес поділяється на сортування пляшок -> наповнення -> пресування гумової пробки -> розміщення кришки -> пресування кришки -> пресування кришки [134].



Рис.9.6. Автоматична лінія по наповненню та закупорюванню НХ-GX011 [134]

Після того, як усі флакони будуть заповнені, потрібно передбачити їх етикування та фасування по коробкам. В одній коробці знаходиться 10 флаконів. Для етикування пропонується використовувати вертикальну етикувальну машину автоматичного типу SBХТ-400І. Її продуктивність – 40 флаконів/хв. Апарат виготовлено з нержавіючої сталі типу SUS304 і піскострумного алюмінієвого сплаву [135].



Рис.9.7. Етикувальна машина SBХТ-400І [135]

Для фасування готового препарату пропонується використати автоматичну машину для пакування флаконів ZH-50S, який вклатиме флакони в вкладиші, які будуть їх тримати. А після цього вклати готові вкладиші з флаконами в коробку. Продуктивність апарату – 20 коробок/хв (без врахування вкладиша). Обладнання виконано зі сталі нержавіючої типу SUS304 [136].

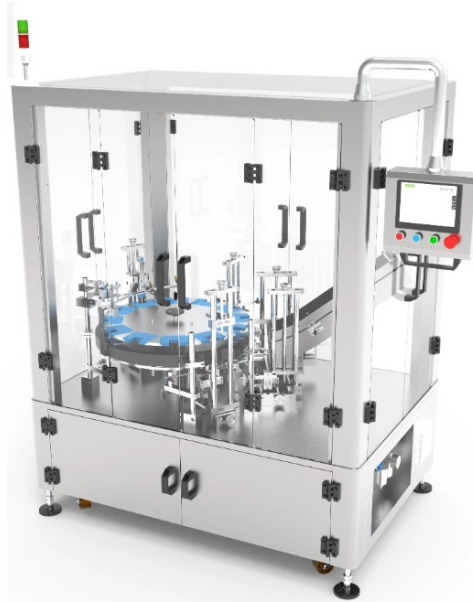


Рис.9.9. Пакувальна машина для флаконів ZH-50S [136]

Через невелику кількість коробок, яка буде на виході, групове пакування буде здійснюватися вручну, а тому не потребує додаткового обладнання.

РОЗДІЛ 10

МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ПЕНІЦИЛОНУ С

В першому розділі визначено, що на серію припадає 2070,38 мг пеніцилону С, що припадає на 170 доз. При цьому, маємо враховувати втрати сировини на стадіях зважування – 0,5%, та наповнення – 0,5 %.

Таблиця 10.1.

Матеріальний баланс на серію лікарського засобу на основі пеніцилону С

Надійшло		Використано	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, мг	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, мг
1	2	3	4
Зважування сировини			
Пеніцилон С	2070,38	Пеніцилон С	2060
Всього:	2070,38	Втрати (0,5%)	10,38
		Всього:	2070,38
Наповнення флаконів			
Флакони	170 флаконів	Матеріали: Контейнери	169
Всього:	170 флаконів	Втрати (0,5%):	1
		Всього:	170 флаконів

Сумарні втрати по виробництву лікарського засобу на основі пеніцилону С становлять 1%.

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Айсина А.В.				РОЗДІЛ 10 МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ПЕНІЦИЛОНУ С			
Перевір.	Резніченко Ю.М.							
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
					Лім.	Арк.	Аркушів	
					105	118		
					Кафедра БТМ			

РОЗДІЛ 11
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ
ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ

Специфікація обладнання, яке використовується для виробництва стерильного порошку для ін'єкцій, що містить пеніцилон С як основну діючу речовину показано в табл.11.1.

Таблиця 11.1.

Специфікація обладнання виробництва стерильного порошку
пеніцилону С

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Металева конструкція заввишки 15 м. Оснащена металевою сіткою для фільтрування грубих забруднюючих частинок.
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний повітряний фільтр для грубого очищення класу очистки G4. Середня утримуюча здатність синтетичного пилу (%) – 65-90. Фільтруючий матеріал – целюлоза. ¹
К-3	Компресор	1	Поршневий повітряний компресор 100 л GTM КСJ2070-100L. 320 л/хв - максимальна продуктивність на виході компресора. Сталевий ресивер на 100 л. 10 бар - робочий тиск. ²
Т-4	Теплообмінник-нагрівач	2	Пластинчастий теплообмінник THERMAKS РТА (GC) -12. Максимальна робоча температура 180 °С. Мінімальна робоча температура -10 °С. Робоче середовище – вода. Теплообмінна поверхня нержавіюча сталь AISI316 (1.4401). ³
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач		
Р-5	Ресивер	1	Ресивер об'ємом 1000 л. Робочий тиск до 10 атм. Діаметр – 800 мм. Висота – 2535 мм. ⁴
Ф-7	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр тонкого очищення стисненого повітря АF 0030 ¾. Максимальний тиск у системі – 16 атмосфер. Гранична температура повітря – 100 °С. Розміри – 305x120 мм. Термін служби картриджа – 3000 годин. ⁵
Ф-8	Фільтр надтонкої очистки повітря	1	Фільтр стислого повітря АF 0476. Робочий тиск до 16 бар, Номінальна пропускна здатність при 7 бар - 510 м ³ /год. ⁶

НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Айсіна А.В.			
Перевір.	Резніченко Ю.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 11 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			106	118
Кафедра БТМ				

Д-9 Д-17	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Рідинний дозатор для дозування рідких компонентів. Дозування до 10000 л. Похибка дозування 1%. ⁷
Ф-10	Фільтр піщаний	1	Фіотр механічної фільтрації води ВФН-1. Продуктивність – 20 м ³ /год. Матеріал корпусу – сталь нержавіюча. ⁸
Ф-11	Фільтр вугільний	1	Промисловий вугільний фільтр РФ-3672. Продуктивність – від 8 до 16 м ³ /год. ⁹
З-12	Збірник для стерилізації води	1	Реактор об'ємом 2000 л. Виготовлений зі сталі нержавіючої 316L. Оснащений подвійною сорочкою та перемішуючим пристроєм. Стійкий до високих температур. ¹⁰
Н-13 Н-16	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий М-400В 1,5 кВт SAER. Продуктивність – 10 м ³ /год. Робочий тиск максимальний – 8 бар. Температура рідини - - 15 °С до +50 °С. ¹¹
ЗО-14	Установка зворотнього осмосу	1	Промислова установка зворотного осмосу, продуктивністю 15 м ³ /год, ROF-15000. Сьупінь очистки води – 99,995%. Фільтр пропускної здатності 0,22 мкм. ¹²
З-15	Збірник для зберігання води для ін'єкцій	1	Реактор об'ємом 1000 л. Виконано зі нержавіючої сталі S.S.316L. Оснащений подвійною сорочкою. Габарити: 3200*3200*6700 мм. ¹³
МСА-18	Миюче-стерилізаційний апарат для флаконів	1	Миєчно-стерилізуючий апарат FOWS. Виконано зі сталі нержавіючої AISI 316Ti. Внутрішня поверхня з шорсткістю менше 0,4 мкм. У камері розташовано 6 зондів RTD PT100 для постійного та негайного моніторингу циклів миття та стерилізації. Все гідравлічне обладнання та всі клапани виготовлені зі сталі AISI 316L із санітарним оздобленням. ¹⁴
МСС-19	Апарат для миття, сушіння та стерилізації гумових пробок	1	Комбінований апарат DS 50 S для миття, сушіння та стерилізації гумових пробок. Об'єм завантаження – 50 л. Габарити: 1900*1500*1900 мм. ¹⁵
С-20	Сухожар	1	Високотемпературна сухожарова шафа для стерилізації MICROSTOP M1E. Об'єм заповнення – 2 л. Габарити: 310*200*250 мм. Максимальна робоча температура – 200 °С. ¹⁶
АНЗ-21	Автоматична лінія по наповненню та закупорюванню	1	Автоматична лінія по наповненню та закупорюванню НХ-GX011. Продуктивність – 40 флаконів/хв. Габарити: 1900 x 1918 x 1167 мм. ¹⁷
Е-22	Етикувальна машина	1	Етикувальна машина SBXT-400I. Продуктивність – 40 флаконів/хв. Габарити: 2000x900x1650 мм. ¹⁸

П-23	Фасувальна машина	1	Пакувальна машина для флаконів ZH-50S. Продуктивність – 20 коробок/хв. Габарити: 1590×1380×1832 мм. ¹⁹
------	-------------------	---	---

Примітка: 1 - <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>, 2 - <https://gtm-ukraine.com.ua/porshneviy-pov-tryaniy-kompresor-100-l-gtm-kcj2070-100l-rem-nniy.html>, 3 - https://opeks.ua/ua/plastinchastij-teploobminnik-thermaks-rta-gc-12/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=SPM_1&gclid=Cj0KCQiAtOmsBhCnARIsAGPa5yY_jVL13WUIE_NryQ0HGM9m_IOJ1XJQChn_flrM-cXBn9PyKJolfRQaAnmMEALw_wcB, 4 - <https://montajnik.com.ua/resiver-1-m3-davlenie-10-atm-iz-uglerodistoy-stali>, 5 - https://ldinvest.ua/uk/af-0030-3-4-filtr-tonkogo-ochishhennya-stisnenogo-povitrya_263.html, 6 - <https://ultrafilter.com.ua/catalog/filtr-ochistki-szhatogo-vozdukha/af-0476-filtr-szhatogo-vozdukha-omega-air/>, 7 - <https://abvstroy.com.ua/ua/p404078789-kontroller-zhidkostnyj-dozator.html>, 8 - https://svitpoluvy.com.ua/p1901996817-filtry-vysokoj-proizvoditelnosti.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiAtOmsBhCnARIsAGPa5yYdkQ1RwKhW17Q6a4Miug1aeL1_SGRtIV4Xw8fANQJQvMCC89knVM8aAo3ZEALw_wcB, 9 - <https://activcarbon.com.ua/uk/product-category/water-filters-uk/ugolnyye-filtry-uk/>, 10 - <https://www.dayuwz.com/2000L-Reactor-Pressure-Vessel-Tank-Reactor-Tank-Pressure-Stirred-Tank-pd589136698.html>, 11 - <https://geyser.com.ua/ru/nasos-tsentrobeznyy-m-400b-15-kvt-saer/>, 12 - <https://arista.in.ua/ua/p19387331-promyshlennaya-ustanovka-obratnogo.html>, 13 - https://www.alibaba.com/product-detail/Stainless-steel-1000L-50000L-continuous-stirred_1600090311227.html, 14 - <https://fedegari.com/ru/prodotto/fows/>, 15 - <http://www.hubermachines.com/stoppersterilizing.htm>, 16 - <https://microstop.ua/product/suhozharovyj-sterilizator-mikrostop/>, 17 - <https://www.szhxmachine.com/products/fully-automatic-vials-filling-and-capping-machine-double-station.html>, 18 - <http://www.sinbon.com.hk/labeling-machine/High-speed-sticker-labe-applicator.shtml>, 19 - <https://pharmach.en.made-in-china.com/product/ROatnhEAWfWm/China-Automatic-Carton-Packaging-Cartoning-Machine-for-Vial-Ampoule-Ice-Cream-Toys-Soap.html>

РОЗДІЛ 12

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОСТЕОМІЄЛІТУ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Повітря одержане на 15 м заввишки потрапляє до системи вентиляції виробництва через повітрозабірник (ПЗ-1).

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Після цього, повітря одразу потрапляє до фільтру грубого очищення (Ф-2). При цьому воно очищується до ступеня в 90%.

ДР 1.3. Компресування повітря

Повітря пропускають через компресор (К-3), де воно стискається до тиску близько 0,4 МПа. При цьому, повітря дуже сильно нагрівається, а тому потребує ретельного охолодження та зменшення вологості, яка буде відбуватись під час процесу заохолодження повітря.

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Попередньо профільтроване повітря потрапляє до теплообміннику-охолоджувача (Т-4). Температуру знижують до 19 °С. Для зниження вологості, яка може спричиняти контамінацію, повітря потрапляє до ресиверу (Р-5) де зайва волога зріджується та видаляється через нижній клапан. Ступінь вологості знижується до 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Після охолодження повітря його знову нагрівають вже до робочої температури шляхом пропуску його через теплообмінник-нагрівач (Т-6) з метою зменшення виходу конденсату. Повітря нагрівають до 24 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в фільтрі тонкого очищення

Нагріте повітря очищається у фільтрі тонкого очищення (Ф-7), досягаючи

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Айсина А.В.</i>			РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОСТЕОМІЄЛІТУ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					109	118
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ступеня очищення в 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в фільтрі надтонкого очищення

Наприкінці, повітря проводить крізь фільтр надочищення (Ф-8), тим самим досягаючи ступеня очистки в 99,999995%. Повітря подається до виробничих приміщень класу А.

ДР 2. Підготовка води для виробництва препарату проти остеомієліту

ДР 2.1. Механічна фільтрація

До фільтру (Ф-10) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-9) подається 1600 л води водопровідної із загальної системи водопостачання. Фільтр затримує частинки в 5 мкм. Тривалість фільтрації – 10 хв.

ДР 2.2. Глибинна фільтрація

Одержана вода потрапляє до вугільного фільтра (Ф-11) де очищається від частинок розміром 1-3 мкм. Тривалість фільтрації – 10 хв.

ДР 2.3. Одержання води очищеної шляхом стерилізації

Вода потрапляє до збірнику (З-12). Кришку реактора закривають, а до його сорочки подають пару насичену та воду охолоджену. Встановлюється режим стерилізації в 131 °С при 0,15 МПа. Тривалість стерилізації – 20 хв. Після цього, відцентровим насосом (Н-13) вода подається до установки зворотнього осмосу (ЗО-15), але не вся, а лише 800 л, які відміряються об'ємно-ваговим дозатором (Д-14).

ДР 2.4. Зворотній осмос для одержання води для ін'єкцій

До установки зворотнього осмосу (ЗО-15) потрапляє вода очищена. Вмикається продуктивність – 2 м³/год. Вода проходить фільтр з діаметром пор в 0,22 мкм. Тривалість очистки – 25 хв. Після цього, вода, під тиском від установки зворотнього осмосу (ЗО-15) вода для ін'єкцій потрапляє в попередньо простерелізований реактор (З-16) на зберігання.

ТП 3. Підготовка флаконів, пробок та пеніцилону С

ТП 3.1. Миття, сушіння та стерилізація флаконів

Скляні флакони потрапляють до миюче-стерилізаційного апарату для флаконів (МСА-18). До апарату додатково підводиться вода очищена від ДР 2.3. та

вода для ін'єкцій від ДР 2.4. за допомогою насосів (Н-13 та Н-17). Дозуюче обладнання передбачено в конструкції МСА-18. Спочатку флакони миють водою очищеною, після чого їх обполіскують водою для ін'єкцій. Одержані вимиті флакони передаються до наступної камери, де сушаться при температурі 100 °С. Після повного просушення, флакони потрапляють до стерилізаційної камери. Встановлюється температура стерилізації – 315 °С. Тривалість усього процесу становить 3 години. Одержані флакони одержуються з іншої сторони апарату, в приміщенні А класу та викладаються в металеву, попередньо оброблену дезінфекційним засобом ємність та подається на наступну стадію (ТП 4).

ТП 3.2. Миття, стерилізація та сушіння гумових пробок

До апарату для миття, сушіння та стерилізації гумових пробок (МСС-19) подаються гумові пробки від скляних флаконів. До апарату додатково підводиться вода очищена від ДР 2.3. та вода для ін'єкцій від ДР 2.4. за допомогою насосів (Н-13 та Н-17). Дозуюче обладнання передбачено в конструкції МСС-19. Спочатку пробки миють водою очищеною, після чого миють водою для ін'єкцій та не зливають її. Пробки починають попередньо стерилізувати у водяній бані при температурі 100 °С. Після чого, воду зливають, та починають стерилізувати вимиті пробки при 121 °С. Після стерилізації, пробки додатково просушують при температурі в 70 °С. Тривалість усього процесу складає 4 години. Одержані пробки одержуються з іншої сторони апарату, в приміщенні А класу та викладаються в металеву, попередньо оброблену дезінфекційним засобом ємність та подається на наступну стадію (ТП 4).

ТП 3.3. Стерилізація пеніцилону С

На аналітичних вагах зважують 2070,38 мг пеніцилону С та висипають вміст у невелику, попередньо оброблену дезінфекційним розчином металеву невеличку поверхню. Дечко вкладають в сухожар (С-20), закривають апарат кришкою та встановлюють температуру в 180 °С та тривалість стерилізації – 30 хв. Після чого, одержаний пеніцилон С виймають з сухожару після його охолодження та передають на наступну стадію (ТП 4).

ТП 4. Наповнення та закупорка флаконів

До автоматичної лінії по наповненню та закупорюванню (АНЗ-21) подають стерильні флакони від ТП 3.1, стерильні пробки від ДР 3.2, та стерильний пеніцилон С від ДР 3.3 до окремих відсіків по прийому. Також, додатково вноситься алюмінієва кришка. Встановлюється дозування – 12,2 мг/флакон. Також, встановлюється продуктивність – 10 флаконів/хв. Апарат ставить в лінію скляні флакони, підводять конвеєром до дозатора порошку, заповнює флакон. Після цього, наповнений флакон рухається далі, його закривають гумовою пробкою та закупорюють алюмінієвою кришкою. Одержані флакони переносяться вручну до етикувальної машини (Е-22) на наступну стадію. Тривалість усього процесу – 20 хв. Вихід флаконів – 170 шт.

ПМФ 5. Етикування флаконів

До етикувальної машини (Е-22) вручну подають готові закупорені флакони. Встановлюється продуктивність апарату – 10 флаконів/хв. Автомат вишукує всі флакони на конвеєр і наносить клеєву стрічку на кожну скляну основу. На етикетці міститься напис про назву препарату, кількості діючої речовини, номеру реєстрації, номеру серії, дати виготовлення та кінцевого терміну придатності. Одержані флакони переносяться вручну до пакувальної машини (П-23) на наступну стадію. Тривалість усього процесу – 20 хв. Вихід флаконів з етикеткою – 170 шт.

ПМФ 6. Пакування готових флаконів

До пакувальної машини (П-23) вручну подають готові закупорені флакони. Встановлюється продуктивність апарату – 10 коробок/хв. Апарат вишукує всі промарковані флакони в ряд на конвеєр. Спочатку, автомат вкладає по 10 флаконів в пластиковий вкладиш. Після чого, передає далі по стрічці та вкладає готовий вкладиш в готову коробку, разом з інструкцією. Тривалість процесу – 30 хв. Вихід коробок – 17 шт.

ПМФ 7. Пакування коробок в групову упаковку

Одержані коробки готового лікарського препарату від ПМФ 6 вручну пакуються в 1 загальну картонну коробку. На коробці наносять інформацію про

номер серії, а також дату виготовлення препарату. Запаковану коробку передають на зберігання на склад при температурі не вище 25 °С.

РОЗДІЛ 13

ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ПЕНІЦИЛОНУ С ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на лікарський засіб пеніцилону С, який являє собою порошок для приготування розчину для ін'єкцій.

Склад: 1 флакон містить пеніцилону С – 12,2 мг

Призначення. Лікування остемієліту.

Форма випуску. По 10 флаконів в пачці.

Специфікація на лікарський засіб наведена в табл. 13.1

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Візуально.

Однорідний порошок, без грудочок, та без сторонніх включень.

2. Кольоровість. Візуальне визначення.

Порошок жовтого кольору

3. рН

Вимірювання проводять потенціометрично використовуючи рН-метр (див. рис.13.1. Перед основним вимірюванням проводять калібрування буферними розчинами з $pH_1=4,01$, $pH_2=7,01$ та $pH_3=10,01$. рН зразку має бути в



межах 5,5 – 8,0

Рис.13.1. рН-метр [137]

					НУХТ БТЕК 02.02.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Айсина А.В.				РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ОСТЕОМІЄЛІТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Резніченко Ю.М.						113	118
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показників контролю	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Однорідний порошок, без грудочок, та без сторонніх включень.	За п. 1 АНД, візуально
Кольоровість	Порошок жовтого кольору	За п. 2 АНД, візуально
pH	Відновлений розчин має мати значення від 5,5 до 8,0	За п. 3 АНД. ДФУ/ЄФ, 2.2.3
Середня маса	48,8 мг ± 5% (від 46,36 мг до 51,24 мг)	За п. 4 АНД.
Однорідність дозованих одиниць	Приймальне число має відповідати вимогам ДФУ/ЄФ, 2.9.40.	За п. 5 АНД. ДФУ/ЄФ, 2.9.40.
Вода	Не більше 5 %	За п. 6 АНД. ДФУ/ЄФ, 2.5.12
Антимікробна активність	Відсутність росту MRSA	За п. 7 АНД.
Механічні включення	Видимі частки: Повинні бути практично відсутніми. Невидимі частки: Середня кількість частинок не перевищує 6000 в 1 флаконі для частинок розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 в 1 флаконі для частинок 25 мкм або більше.	За п. 8 АНД. ДФУ/ЄФ, 2.9.20, 2.9.19, метод 1
Стерильність	Препарат повинен бути стерильним.	За п. 9 АНД, ДФУ/ЄФ 2.6.1.

4. Середня маса

Зважування здійснюють на аналітичні ваги з класом точності 1.

Вага порошку у флаконі має бути $12,2 \text{ мг} \pm 5\%$.

5. Однорідність дозованих одиниць.

Розраховують приймальне число, як описано в ДФУ/ЄФ, табл. 2.9.40 2.

Приймальне число має відповідати вимогам ДФУ/ЄФ, 2.9.

6. Вода. ДФУ/ЄФ, 2.5.12

Визначення проводять з 0,1 г препарату напівмікрометодом. Як розчинник використовують *метанол безводний Р*.

7. Антагоністична активність

Визначають за допомогою 96 лункового планшету. Для цього 20 мкл розчину пеніцинолу С в концентрації 31,25 мкг/мл розподіляють в 96-лунковий планшет, і в кожну лунку інокують 80 мкл MRSA середньої логарифмічної фази, таким чином, що кінцева концентрація білку становила 6,25 мкг/мл. Після 24 годин інкубації при 37 °С ріст тестового організму оцінюють шляхом вимірювання оптичної густини OD_{490} . Як контроль, використовують культури кишкової палички без антимікробного пептиду. Ріст MRSA має бути відсутнім в лунках, де містився пеніцинол С [5]. Тобто, значення оптичної густини має бути нижчим у лунках з пеніцилоном С, ніж у лунках, де його немає. Для даного аналізу використовують мікропланшетний рідер. Для даного аналізу достатньо

8. Механічні включення.

Видимі частинки (ДФУ/ЄФ, 2.9.20). Мають бути практично відсутні.

Кількість - 20 флаконів.

До кожного флакону додають воду ін'єкційну Р, у кількості достатній для розчинення випробовуваного зразка, забезпечуючи відсутність контамінації зразка частинками, відстоюють флакони не менше 5 хвилин до повного розчинення вмісту, періодично струшуючи.

В темній кімнаті для перегляду здійснюють перегляд підготовлених зразків. Флакони перевертають і проводять візуальний перегляд спочатку перед білим екраном пристрою, а потім – перед чорним екраном.

Препарат не проходить випробування, якщо одна або більше частинок були виявлені в більш ніж 2 флаконах з 20 досліджених.

Невидимі частинки (ДФУ/ЄФ, 2.9.19).

Кількість - 10 флаконів

В мірну ємність в ламінарному боксі перенести розчин з 10 флаконів та довести об'єм до 200 мл водою для ін'єкцій, Р.

Провести відстоювання зразка не менше 5 хв, відкрити ємність та помістити на відбір проб для контролю методом світлоблокування.

Контроль здійснюється за допомогою приладу, заснованому на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість та розмір частинок, з автоматичним розрахунком кількості частинок в 20 мл, що відповідає 1 флакону.

Препарат проходить випробування, якщо середня кількість частинок у випробовуваних одиницях не перевищує 6000 в 1 контейнері для частинок розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 в 1 контейнері для частинок розміром 25 мкм або більше.

9. Стерильність. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ/ЄФ, 2.6.1.

Порошок для ін'єкцій попередньо відновлюють згідно інструкції застосування водою ін'єкційною. Вміст контейнера з випробуваним зразком переносять на мембранний фільтр. Відразу фільтрують. Після фільтрування мембранний фільтр відмивають стерильним розчинником не менше трьох разів, об'ємом не більше 100 мл на одну порцію. Після відмивання мембранний фільтр переносять у живильне середовище. Один фільтр вносять у рідке тіогриколеве середовище, для аналізу росту анаеробних бактерій та другий фільтр на соєво-казеїнове середовище призначене для вирощування грибів та аеробних бактерій. Посіви інкубують не менше 14 діб.

Препарат повинен бути стерильним.

Пакування.

По 10 флаконів разом з інструкцією по використанню вкладають у пачку.

Маркування.

На пачці має бути зазначене торгове найменування, склад, спосіб застосування, термін придатності, спосіб застосування, штрих-код, виробник.

Транспортування.

При температурі від 2°C до 8°C у спеціалізованому транспорті.

Зберігання.

Зберігати у недоступному для дітей місці при температурі не вище 25 °C.

Термін придатності.

3 роки. Після додавання розчинника розчин зберігати не більше 3 діб при кімнатній температурі, або не більше 7 діб в холодильнику.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Algammal A. M., Hetta H. F., Elkelish A., Alkhalifah D. H. H., Hozzein W. N., Batiha G. E. S., et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*. 2020: 3255-3265. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>
2. Turner N. A., Sharma-Kuinkel B. K., Maskarinec S. A., Eichenberger E. M., Shah P. P., Carugati M., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*. 2019, 17(4): 203-218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
3. Gao Y., Chen Y., Cao Y., Mo A., Peng Q. Potentials of nanotechnology in treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of medicinal chemistry*. 2021, 213: 113056. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113056>
4. Kim M. C., Cullum R., Hebshy A. M., Mohamed H. A., Faraag A. H., Salah N. M., et al. Mersaquinone, A new tetracene derivative from the marine-derived *Streptomyces* sp. EG1 exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*. 2020, 9(5): 252. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050252>
5. Chen M., Shen N. X., Chen Z. Q., Zhang F. M., Chen Y. Penicilones A–D, anti-MRSA azaphilones from the marine-derived fungus *Penicillium janthinellum* HK1-6. *Journal of Natural Products*. 2017, 80(4): 1081-1086. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01179>
6. Nicoletti R., Andolfi A. The marine-derived filamentous fungi in biotechnology. *Grand Challenges in Marine Biotechnology*. 2018. P. 157-189. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69075-9_4
7. Manohar C. S., Raghukumar C. Fungal diversity from various marine habitats deduced through culture-independent studies. *FEMS microbiology letters*. 2013, 341(2): 69-78. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12087>

8. Cárdenas M., Guevara-Suárez M., Marbello A., Bolaños N., Jiménez P., Restrepo S. *Micromycetes* of Colombia: Focusing on the Hidden Diversity. Catalogue of fungi of Colombia. 2022.
9. Kondratiuk T. O., Beregova T. V., Ostapchenko L. I. Diversity of Antarctic microorganisms–potential producers of biologically active substances. *Український антарктичний журнал*. 2016, 15: 176—182.
10. Fukuda T., Kurihara Y., Kanamoto A., Tomoda H. Terretonin G, a new sesterterpenoid antibiotic from marine-derived *Aspergillus* sp. OPMF00272. *The Journal of Antibiotics*. 2014, 67(8): 593-595. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.46>
11. Wu B., Wiese J., Labes A., Kramer A., Schmaljohann R., Imhoff J. F. Lindgomycin, an unusual antibiotic polyketide from a marine fungus of the *Lindgomycetaceae*. *Marine drugs*. 2015, 13(8): 4617-4632. <https://doi.org/10.3390/md13084617>
12. Wu B., Wiese J., Wenzel- Storjohann A., Malien S., Schmaljohann R., Imhoff J. F. Engyodontochones, antibiotic polyketides from the marine fungus *Engyodontium album* strain LF069. *Chemistry–A European Journal*. 2016, 22(22): 7452-7462. <https://doi.org/10.1002/chem.201600430>
13. Wu B., Oesker V., Wiese J., Schmaljohann R., Imhoff J. F. Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. *Marine drugs*. 2014, 12(3): 1208-1219. <https://doi.org/10.3390/md12031208>
14. Augner D., Krut O., Slavov N., Gerbino D. C., Sahl H. G., Benting J., et al. On the antibiotic and antifungal activity of pestalone, pestalachloride A, and structurally related compounds. *Journal of natural products*. 2013, 76(8): 1519-1522. <https://dx.doi.org/10.1021/np400301d>
15. Wu B., Oesker V., Wiese J., Malien S., Schmaljohann R., Imhoff J. F. Spirocyclic drimanes from the marine fungus *Stachybotrys* sp. strain MF347. *Marine Drugs*. 2014, 12(4): 1924-1938. <https://doi.org/10.3390/md12041924>
16. Buttachon S., Ramos A. A., Inácio Â., Dethoup T., Gales L., Lee M., et al. Bis-indolyl benzenoids, hydroxypyrrolidine derivatives and other constituents from

cultures of the marine sponge-associated fungus *Aspergillus candidus* KUFA0062. *Marine Drugs*. 2018, 16(4): 119. <https://doi.org/10.3390/md16040119>

17. Bao J., Sun Y. L., Zhang X. Y., Han Z., Gao H. C., He F., et al. Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023. *The Journal of antibiotics*. 2013, 66(4): 219-223. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.110>

18. Kumla D., Shine Aung T., Buttachon S., Dethoup T., Gales L., Pereira J. A., et al. A new dihydrochromone dimer and other secondary metabolites from cultures of the marine sponge-associated fungi *Neosartorya fennelliae* KUFA 0811 and *Neosartorya tsunodae* KUFC 9213. *Marine Drugs*. 2017, 15(12): 375. <https://doi.org/10.3390/md15120375>

19. Pan C., Shi Y., Auckloo B. N., Chen X., Chen C. T. A., Tao X., Wu B. An unusual conformational isomer of verrucosidin backbone from a hydrothermal vent fungus, *Penicillium* sp. Y-50-10. *Marine Drugs*. 2016, 14(8): 156. <https://doi.org/10.3390/md14080156>

20. Zhou X. M., Zheng C. J., Song X. P., Han C. R., Chen W. H., Chen G. Y. Antibacterial α -pyrone derivatives from a mangrove-derived fungus *Stemphylium* sp. 33231 from the South China Sea. *The Journal of Antibiotics*. 2014, 67(5): 401-403. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.6>

21. Wang J. F., Lin X. P., Qin C., Liao S. R., Wan J. T., Zhang T. Y., et al. Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6. *The Journal of antibiotics*. 2014, 67(8): 581-583. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.39>

22. Farag A. M., Hassan S. W., Beltagy E. A., El-Shenawy M. A. Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. *The egyptian journal of aquatic research*. 2015, 41(4): 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.002>

23. Bhargavi M., Madhuri R. J. Bio Potential of a Marine fungus *Sarocladium kiliense* in Fermentative production of Anti-cancer Enzyme L-Asparaginase using Solid Waste substrates and Evaluation of its Cytotoxic Role against Jurkat J6 and PA1 Cell

lines. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*. 2022, 1-9.
<https://doi.org/10.1007/s41208-022-00428-2>

24. Abd El Aty A. A., Wehaidy H. R., Mostafa F. A. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett–Burman and Taguchi methods. *Carbohydrate polymers*. 2014, 102: 261-268.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.007>

25. Aida F. M., Al-Nusarie S., Taghreed S. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*. 2014, 13(14).
<https://doi.org/10.5897/AJB2014.13628>

26. Del-Cid A., Ubilla P., Ravanal M. C., Medina E., Vaca I., Levicán G., et al. Cold-active xylanase produced by fungi associated with Antarctic marine sponges. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014, 172: 524-532.
<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0551-1>

27. Arfi Y., Chevret D., Henrissat B., Berrin J. G., Levasseur A., Record E. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nature communications*. 2013, 4(1): 1810.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2850>

28. de Queiroz Baptista N. M., Solidônio E. G., de Arruda F. V. F., de Melo E. J. V., de Azevedo Callou M. J., de Miranda R., et al. Effects of gamma radiation on enzymatic production of lignolytic complex by filamentous fungi. *African Journal of Biotechnology*. 2015, 14(7): 612-621. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2014.14283>

29. Atalla M. M., Zeinab H. K., Eman R. H., Amani A. Y., Abeer A. A. E. A. Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Saudi journal of biological sciences*. 2013, 20(4): 373-381.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.001>

30. Chen C. C., Chi Z., Liu G. L., Jiang H., Hu Z., Chi Z. M. Production, purification, characterization and gene cloning of an esterase produced by

- Aureobasidium melanogenum* HN6. 2. *Process Biochemistry*. 2017, 53: 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.006>
31. Kar S., Sona Gauri S., Das A., Jana A., Maity C., Mandal A., et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013, 36: 57-68. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0761-x>
32. Farag A. M., Hassan S. W., El-Says A. M., Ghanem K. M. Purification, characterization and application of tannase enzyme isolated from marine *Aspergillus nomius* GWA5. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018, 12(4): 1939-1950. <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.4.30>
33. Nair S., Abraham J. Biosynthesis and characterization of yellow pigment from *Aspergillus nidulans* strain JAS3 isolated from Thirumullavaram, Indian Ocean and its therapeutic activity against clinical pathogens. *Biologia*. 2023, 78(4): 1171-1185. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01337-2>
34. Venkatachalam M., Zelena M., Cacciola F., Ceslova L., Girard-Valenciennes E., Clerc P., et al. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, 67: 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.036>
35. Saravanan A., Jayasree R., Kumar P. S., Varjani S., Hemavathy R. V., Jeevanantham S., Yaashikaa P.R. Production of pigment using *Aspergillus tamarii*: New potentials for synthesizing natural metabolites. *Environmental Technology & Innovation*. 2020, 19: 100967. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100967>
36. Lingappa S., Ganapathi S., Awasthi S., Somasundaram S. T. Isolation and Characterization of Marine fungi for their Bioactive pigments. *Adv. Biores.* 2022, 13(4): 62-75. <https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.13.4.6275>
37. Sibero M. T., Triningsih D. W., Radjasa O. K., Sabdono A., Trianto A. Evaluation of antimicrobial activity and identification of yellow pigmented marine

sponge-associated fungi from Teluk Awur, Jepara, Central Java. *J. Biotechnol.* 2016, 21: 1-11. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.26058>

38. Bouhri Y., Askun T., Tunca B., Deniz G., Aksoy S. A., Mutlu M. The orange-red pigment from *Penicillium mallochii*: Pigment production, optimization, and pigment efficacy against Glioblastoma cell lines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2020, 23: 101451. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101451>

39. Saravanan D., Radhakrishnan M. Antimicrobial activity of pigments produced by fungi from Western Ghats. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016, 8(1): 634-638.

40. da Costa Souza P. N., Grigoletto T. L. B., de Moraes L. A. B., Abreu L. M., Guimarães L. H. S., Santos C., et al. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. *Microbiology.* 2016, 162(1): 12-22. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000168>

41. Barakat K., Saleh M. Bioactive Betulin produced by marine *Paecilomyces* WE3-F. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2016, 6(3): 034-040. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60306>

42. Neethu S., Midhun S. J., Radhakrishnan E. K., Jyothis M. Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial pathogenesis.* 2018, 116: 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.033>

43. Ameen F., Al-Homaidan A. A., Al-Sabri A., Almansob A., AlNadhari S. Anti-oxidant, anti-fungal and cytotoxic effects of silver nanoparticles synthesized using marine fungus *Cladosporium halotolerans*. *Applied Nanoscience.* 2023, 13(1): 623-631. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01874-9>

44. Vala A. K. Exploration on green synthesis of gold nanoparticles by a marine- derived fungus *Aspergillus sydowii*. *Environmental Progress & Sustainable Energy.* 2015, 34(1): 194-197. <https://doi.org/10.1002/ep.11949>

45. Salgado C. L., Muñoz R., Blanco A., Lienqueo M. E. Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi

- Paradendryphiella salina* to produce mycoprotein. *Algal Research*. 2021, 53: 102135.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102135>
46. Landeta-Salgado C., Cicatiello P., Lienqueo M. E. Mycoprotein and hydrophobin like protein produced from marine fungi *Paradendryphiella salina* in submerged fermentation with green seaweed *Ulva* spp. *Algal Research*. 2021, 56: 102314. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102314>
47. Chen Y., Mao W., Gao Y., Teng X., Zhu W., Chen Y., et al. Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by the marine fungus *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate polymers*. 2013, 93(2): 478-483.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.047>
48. Chen Y., Mao W. J., Yan M. X., Liu X., Wang S. Y., Xia Z., et al. Purification, chemical characterization, and bioactivity of an extracellular polysaccharide produced by the marine sponge endogenous fungus *Alternaria* sp. SP-32. *Marine Biotechnology*. 2016, 18: 301-313.
49. Chen S., Ding R., Zhou Y., Zhang X., Zhu R., Gao X. D. Immunomodulatory effects of polysaccharide from marine fungus *Phoma herbarum* YS4108 on T cells and dendritic cells. *Mediators of inflammation*. 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/738631>
50. Li H., Cao K., Cong P., Liu Y., Cui H., Xue C. Structure characterization and antitumor activity of the extracellular polysaccharide from the marine fungus *Hansfordia sinuosae*. *Carbohydrate polymers*. 2018, 190: 87-94.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.077>
51. Prathyusha A. M. V. N., Sheela G. M., Bramhachari P. V. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. *Biotechnology Reports*. 2018, 19: e00277.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00277>
52. Yuan M. X., Qiu Y., Ran Y. Q., Feng G. K., Deng R., Zhu X. F., et al. Exploration of indole alkaloids from marine fungus *Pseudallescheria boydii* F44-1

using an amino acid-directed strategy. *Marine drugs*. 2019, 17(2): 77. <https://doi.org/10.3390/md17020077>

53. Yang J., Jiao R. H., Yao L. Y., Han W. B., Lu Y. H., Tan R. X. Control of fungal morphology for improved production of a novel antimicrobial alkaloid by marine-derived fungus *Curvularia* sp. IFB-Z10 under submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 2016, 51(2): 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.025>

54. Teixeira T. R., Rangel K. C., Tavares R. S. N., Kawakami C. M., Dos Santos G. S., Maria-Engler S. S., et al. In Vitro Evaluation of the photoprotective potential of quinolinic alkaloids isolated from the Antarctic marine fungus *Penicillium echinulatum* for topical use. *Marine Biotechnology*. 2021, 23: 357-372. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10030-x>

55. Guo Y. W., Liu X. J., Yuan J., Li H. J., Mahmud T., Hong M. J., et al. L-tryptophan induces a marine-derived *Fusarium* sp. to produce indole alkaloids with activity against the Zika virus. *Journal of Natural Products*. 2020, 83(11): 3372-3380. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00717>

56. Gago F. Computational Approaches to Enzyme Inhibition by Marine Natural Products in the Search for New Drugs. *Marine Drugs*. 2023, 21(2): 100. <https://doi.org/10.3390/md21020100>

57. Copeland R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. *John Wiley & Sons*. 2013.

58. Wu B., Ohlendorf B., Oesker V., Wiese J., Malien S., Schmaljohann R., Imhoff J. F. Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. strain LF458. *Marine biotechnology*. 2015, 17: 110-119. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9599-3>

59. Hawas U. W., Al-Farawati R., Abou El-Kassem L. T., Turki A. J. Different culture metabolites of the Red Sea fungus *Fusarium equiseti* optimize the inhibition of hepatitis C virus NS3/4A protease (HCV PR). *Marine drugs*. 2016, 14(10): 190. <https://doi.org/10.3390/md14100190>

60. Yu X., Li L., Sun S., Chang A., Dai X., Li H., et al. A cyclic dipeptide from marine fungus *Penicillium chrysogenum* DXY-1 exhibits anti-quorum sensing

- activity. *ACS omega*. 2021, 6(11): 7693-7700.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00020>
61. Ahmed E. F., Rateb M. E., Abou El-Kassem L. T., Hawas U. W. Anti-HCV protease of diketopiperazines produced by the Red Sea sponge-associated fungus *Aspergillus versicolor*. *Applied biochemistry and microbiology*. 2017, 53: 101-106.
<https://doi.org/10.1134/S0003683817010021>
62. Avalos M., Garbeva P., Vader L., van Wezel G. P., Dickschat J. S., Ulanova D. Biosynthesis, evolution and ecology of microbial terpenoids. *Natural Product Reports*. 2022, 39(2): 249-272. <https://doi.org/10.1039/d1np00047k>
63. Botta L., Saladino R., Barghini P., Fenice M., Pasqualetti M. Production and identification of two antifungal terpenoids from the *Posidonia oceanica* epiphytic *Ascomycota Mariannaea humicola* IG100. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19(1): 1-10.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01445-7>
64. Medina R. P., Araujo A. R., Batista Jr J. M., Cardoso C. L., Seidl C., Vilela A. F., et al. Botryane terpenoids produced by *Nemania bipapillata*, an endophytic fungus isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis*-Falkenbergia stage. *Scientific Reports*. 2019, 9(1): 12318. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48655-7>
65. Hong X., Guan X., Lai Q., Yu D., Chen Z., Fu X., et al. Characterization of a bioactive meroterpenoid isolated from the marine-derived fungus *Talaromyces* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022, 106(8): 2927-2935.
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-11914-1>
66. Devi R., Kaur T., Guleria G., Rana K. L., Kour D., Yadav N., et al. Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier. 2020. P. 147-161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7>
67. Thatoi H., Behera B. C., Mishra R. R. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. *Mycology*. 2013, 4(1): 54-71.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2013.785448>

68. Habbu P., Warad V., Shastri R., Madagundi S., Kulkarni V. H. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chinese journal of natural medicines*. 2016, 14(2): 101-116. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2016.00101>
69. Lee Y. M., Kim M. J., Li H., Zhang P., Bao B., Lee K. J., Jung J. H. Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. *Marine biotechnology*. 2013, 15: 499-519. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9506-3>
70. Zorofchian M. S., Nikzad S., Abdul Kadir H., Abubakar S., Zandi K. Potential antiviral agents from marine fungi: An overview. *Marine drugs*. 2015, 13(7): 4520-4538. <https://doi.org/10.3390/md13074520>
71. Silva V., Araújo S., Monteiro A., Eira J., Pereira J. E., Maltez L., et al. *Staphylococcus aureus* and MRSA in Livestock: Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages. *Microorganisms*. 2023, 11(1): 124. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010124>
72. Gajdács M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2019, 8(2): 52. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020052>
73. Siddiqui A. H., Koirala J. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *StatPearls Publishing*. 2021.
74. ОСТЕОМІЄЛІТ: СИМПТОМИ ТА МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://oxford-med.com.ua/ua/media-center/publikacii/osteomyelit-simptomu-i-metody-lecheniya/>
75. Hatzenbuehler J., Pulling T. J. Diagnosis and management of osteomyelitis. *American family physician*. 2011, 84(9): 1027-1033.
76. ОКСАЦИЛІН-КМП. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=3902>
77. Бі-септ-Фармак таблетки по 400 мг/80 мг №20. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%91%D0%B8-%D1%81%D0%B5%D0%BF%D1%82-%D1%84%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B0%D0%BA/10418/#productCardFeatures>

78. Суметролім таблетки по 400 мг/80 мг №20 (10x2). [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%A1%D1%83%D0%BC%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC/16329/#productCardFeatures>

79. Трицептол таблетки по 400 мг/80 мг №20 (10x2). [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%A2%D1%80%D0%B8%D1%81%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%BB/2366/#productCardFeatures>

80. Бісептол суспензія ор. 200 мг/40 мг/5 мл по 80 мл у флак. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%91%D0%B8%D1%81%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%BB/3524/#productCardFeatures>

81. Ванкоміцин-Фармекс ліофілізат для р-ну д/інф. по 1000 мг №1 у флак. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%92%D0%B0%D0%BD%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD-%D1%84%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BA%D1%81/28931/#productCardFeatures>

82. Ванкоміцин-Віста ліофілізат для р-ну д/інф. по 1000 мг №1 у флак. скл. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%92%D0%B0%D0%BD%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD-%D0%92%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0/39282/#productCardFeatures>

83. penicilone С. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<http://www.chemspider.com/chemical-structure.61708593.html>

84. Phenol, 4,4-(1-methylethylidene)bis-, polymer with (chloromethyl)oxirane, 2-methyl-2-propenoate, reaction products with formaldehyde-phenol polymer. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB81214510.htm

85. 2-(chloromethyl)oxirane,formaldehyde,4-[2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol,2-methylprop-2-enoic acid,phenol. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.molbase.com/cas/68002-44-8.html>
86. Остеомієліт [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/handbooks-uk/nozologia-dovidnyk/osteomiyelit/>
87. Лікарські форми для ін'єкцій. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://stud.com.ua/27638/meditsina/likarski_formi_inyektsiy
88. ІН'ЄКЦІЙНЕ ТА ІНФУЗІЙНЕ ВВЕДЕННЯ ЛІКІВ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://profimed.com.ua/likuval-no-profilaktychnyy-pidrozdil/sestryns-ki-manipuliatsii/in-iektsiyne-ta-infuziyne-vvedennia-likiv/>
89. Лікарські форми для ін'єкцій (Formae medicamentorum pro injectionibus). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pidru4niki.com/68415/meditsina/likarski_formi_dlya_inyektsiy_formae_medicamentorum_pro_injectionibus
90. Powder Vials. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.aenova-group.com/en/manufacturing/sterile-technologies/powder-vials>
91. Nandhini P., Kumar P., Mickymaray S., Alothaim A. S., Somasundaram J., Rajan M. Recent developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: a review. *Antibiotics*. 2022, 11(5): 606. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606>
92. Flewelling A. J., Bishop A. L., Johnson J. A., Gray C. A. Polyketides from an endophytic *Aspergillus fumigatus* isolate inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* and MRSA. *Natural product communications*. 2015, 10(10): 1934578X1501001009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26669098/>
93. Le H. M. T., Do Q. T., Doan M. H. T., Vu Q. T., Nguyen M. A., Vu T. H. T., et al. Chemical composition and biological activities of metabolites from the marine fungi *Penicillium* sp. isolated from sediments of Co To Island, Vietnam. *Molecules*. 2019, 24(21): 3830. <https://doi.org/10.3390/molecules24213830>

94. Osteomyelitis. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/9495-osteomyelitis#:~:text=Osteomyelitis%20affects%20about%202%20to%205%20out%20of%20every%2010%2C000%20people.>
95. Населення Дніпропетровської області. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bankchart.com.ua/world/spravochniki/naseleniye_mira/ukraine/6
96. Wu H., Jia C., Wang X., Shen J., Tan J., Wei Z., et al. The impact of methicillin resistance on clinical outcome among patients with *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: a retrospective cohort study of 482 cases. *Scientific Reports*. 2023, 13(1): 7990. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35111-w>
97. Оxacillin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.rxlist.com/oxacillin-drug.htm>
98. Povoа Н. С. С., Schimidt D. В. Exposure to oxacillin subinhibitory concentrations and in vitro induction of resistance expression in heteroresistant and non-heteroresistant oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA). *bioRxiv*. 2023, 2023-01. <https://doi.org/10.1101/2023.01.24.521449>
99. Penicilone С. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/139589680>
100. Penicilone С. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.chemspider.com/chemical-structure.61708593.html>
101. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
102. penicilone А. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicilone-A>
103. Екстракційно-фотометричне визначення барвників у харчових продуктах. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://chem.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2016/11/%D0%95%D0%BA%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D0%BE-%D1%84%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%>

[B8%D1%87%D0%BD%D0%B5-%D0%B2%D0%B8%D0%B7%D0%BD%D0%B0%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F-%D0%B1%D0%B0%D1%80%D0%B2%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2-%D1%83-%D1%85%D0%B0%D1%80%D1%87%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%85-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D0%B0%D1%85.pdf](#)

104. Zhang Z., Liu J. L., Lan J. Y., Duan C. J., Ma Q. S., Feng J. X. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forests in China, and their use in finding highly efficient β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-107>

105. Zhang J., Elser J. J. Carbon: nitrogen: phosphorus stoichiometry in fungi: a meta-analysis. *Frontiers in microbiology*. 2017, 8: 1281. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01281>

106. Zheng W., Zheng X., Wu Y., Lv S., Ge C., Wang X., et al. Diversity Temporal–Spatial Dynamics of Potato Rhizosphere Ciliates and Contribution to Nitrogen-and Carbon-Derived Nutrition in North-East China. *Plants*. 2023, 12(12): 2260. <https://doi.org/10.3390/plants12122260>

107. Ikanone C. E. O., Oyekan P. O. Effect of boiling and frying on the total carbohydrate, vitamin C and mineral contents of Irish (*Solanum tuberosum*) and sweet (*Ipomea batatas*) potato tubers. *Nigerian Food Journal*. 2014, 32(2): 33-39. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30115-6](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30115-6)

108. Penicilone C. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.chemspider.com/chemical-structure.61708593.html>

109. Penicilone A. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.chemspider.com/chemical-structure.61708591.html>

110. Chadni Z., Rahaman M. H., Jerin I., Hoque K. M. F., Reza M. A. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycology*. 2017, 8(1): 48-57. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1302013>

111. Локомотивні експлуатаційні матеріали: навч. посіб. Ч. 1. Паливо / Д. С. Жалкін, С. Г. Жалкін, В. Г. Пузир, О. О. Анацький; за заг. ред. проф. С. Г. Жалкіна. – Харків: УкрДУЗТ, 2021. – 106 с.

112. рН-метр/ОВП-метр/Кондуктометр/TDS-метр/Солемір водозахищений з АКТ EZODO 7200. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://simvolt.ua/rn-ovp-konduktometr-solemr-termometr-vodozahischniy-z-akt-ezodo-7200.html/>

113. Ареометр для спирта Стеклоприбор АСП-3 70-100 %. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://epicentrk.ua/shop/mplc-areometr-dlya-spirtu-skloprilad-asp-3-70-100-1ec329e9-d884-6eae-8bae-a128166d8de0.html>

114. Радарний рівеньмер VEGAPULS 21. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1490956645-radarnyj-urovnemer-vegapuls.html?&primelead=NC44>

115. Аналітичні ваги ХА 5У Radwag, d 0.00001 г, 1 клас, сенсорні 10". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://labimpex.com.ua/ua/p1711143217-analitcheskie-vesy-radwag.html>

116. Аналізатор вологості KERN DLB 160-3A. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventalab.ua/analizator-vologosti-kern-dlb-160-3a/>

117. #9ISG019065090 UVM 340 - Monochromator based Reader. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.innov-sol.com/UVM-340-Monochromator-based-Reader-p/9isg019065090.htm>

118. СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.

119. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

120. Деззасоби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/cat-disinfection>

121. Хлор Ліквід, 5 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://marimed.com.ua/item/chlor-likvid-5-l/>
122. Бланидас-Ц Гіпохлорит (Blanidas-C Hypochlorite) - засіб дезінфікуючий, 20 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/ua/136733421/p136733421/>
123. НОВОХЛОР-ЭКСТРА. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/novohlor-ekstra>
124. Фамідез Форте. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.info-dent.com.ua/product/famidez_forte/
125. Концентрований дезінфектант на основі четвертинного амонію та глутарового альдегіду Кено Сід 210 (Keno Sid 210) CID LINES N. V. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/ua/205469773/p205469773/>
126. Экомент Форте, 1000 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/p610891348-ekoment-forte-1000.html>
127. ДЕЗИНФЕКТАНТ БЛАНИДАС-А ОКСИ 35, 30Л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.5sec-pro.com.ua/ru/blandas-a-oks-35-30l-35kg.html>
128. Ecolab, Stabicip seec, 21 кг, жидкий неорганический усилитель очистки на основе перекиси водорода. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://xn--80aditftnv.xn--j1amh/ru/ecolab-stabicip-seec-21-kh-zhydkyi-neorhanycheskyi-usylytel-ochystky-na-osnove-perekysy-vodoroda/>
129. Sanitari Cleaner очищающее средство антибактериального действия. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1325397099-sanitari-cleaner-ochischayuschee.html>
130. Виробництво інфузійних розчинів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://buklib.net/books/36223/>
131. FOWS – МОЕЧНЫЙ АППАРАТ-СТЕРИЛИЗАТОР. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://fedegari.com/ru/prodotto/fows/>

132. HUBER Systems. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.hubermachines.com/stoppersterilizing.htm>

133. ВИСОКОТЕМПЕРАТУРНА СУХОЖАРОВА ШАФА ДЛЯ СТЕРИЛІЗАЦІЇ MICROSTOP M1E. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://microstop.ua/product/suhozharovyj-sterilizator-mikrostop/>

134. Fully Automatic Vials Filling and Capping Machine Double Station. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.szhxmachine.com/products/fully-automatic-vials-filling-and-capping-machine-double-station.html>

135. High speed sticker label applicator. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.sinbon.com.hk/labeling-machine/High-speed-sticker-label-applicator.shtml>

136. Automatic Carton Packaging Cartoning Machine for Vial/Ampoule/Ice Cream/Toys/Soap. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmach.en.made-in-china.com/product/ROatnhEAWfWm/China-Automatic-Carton-Packaging-Cartoning-Machine-for-Vial-Ampoule-Ice-Cream-Toys-Soap.html>

137. Стационарный pH-метр Thermo Fisher Eutech pH 700. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ventalab.ua/ru/ph-metr-thermo-fisher-eutech-ph-700-statsionarniy/>