

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

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВЕРГУН Юлії Віталіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія антибіотиків групи багроміцинів
керівник роботи БУЦЕНКО Людмила Миколаївна, проф.,
д.б.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: *Streptomyces* sp.; цільовий продукт:
багреміцини

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

Розділ 1. Промислове застосування речовин, синтезованих представниками роду *Streptomyces*.

Розділ 2. Особливості мікробного біосинтезу метаболітів багреміцинової природи при

культивуванні стрептоміцетів. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва

багреміцинів для лікарського засобу. Розділ 4. Обґрунтування стадій виділення і очищення

багреміцинів. Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків

по стадіях. Розділ 6. Специфікація обладнання для одержання багреміцинів. Розділ 7. Опис

технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення багреміцинів для одержання

лікарського засобу. Розділ 8. Контроль виробництва багреміцинів для лікарського засобу. Розділ

9. Обґрунтування вибору технологічної схеми лікарського засобу на основі багреміцинів. Розділ

10. Специфікація обладнання виробництва ін'єкційного препарату на основі багреміцинів.

Розділ 11. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти бактеріємії. Розділ 12.
Опис ін'єкційного препарату на основі багреміцинів згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна та апаратурна схеми виділення та очищення багреміцинів – по 1
аркушу листа формату А1; Технологічна та апаратурна схеми виробництва

лікарського засобу на основі багреміцинів – 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. Промислове застосування речовин, синтезованих представниками роду <i>Streptomyces</i> .	01.11.2023-10.11.2023	
2	Розділ 2. Особливості мікробного біосинтезу метаболітів багреміцинової природи при культивуванні стрептоміцетів.	11.11.2023-20.11.2023	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва багреміцинів для лікарського засобу.	21.11.2023-26.11.2023	
4	Розділ 4. Обґрунтування стадій виділення і очищення багреміцинів.	27.11.2023-13.12.2023	
5	Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.	14.12.2023-17.12.2023	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання для одержання багреміцинів.	18.12.2023-24.12.2023	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення багреміцинів для одержання лікарського засобу.	25.12.2023-28.12.2023	
8	Розділ 8. Контроль виробництва багреміцинів для лікарського засобу.	29.12.2023-04.01.2024	
9	Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми лікарського засобу на основі багреміцинів.	05.01.2024-07.01.2024	
10	Розділ 10. Специфікація обладнання виробництва ін'єкційного препарату на основі багреміцинів.	08.01.2024-12.01.2024	
11	Розділ 11. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти бактеріємії.	13.01.2024-14.01.2024	
12	Розділ 12. Опис ін'єкційного препарату на основі багреміцинів згідно АНД	15.01.2024-16.01.2024	
13	Оформлення пояснювальної записки	17.01.2024-18.01.2024	
14	Оформлення креслень – графічної частини роботи	25.11.2023-20.01.2023	

Здобувач

_____ (підпис)

Юлія ВЕРГУН

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Людмила БУЦЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Роботу присвячено новим антибіотикам, які мають назву багреміцини. За літературним оглядом, було визначено проміжкові метаболіти, які напряму впливають на синтезу цієї групи антибіотиків, а саме пара-кумарова кислота та 3-аміно-4-гідроксибензойна кислота. Найближчим за структурою антибіотиком до багреміцинів є феровердини, які синтезуються за тих самих умов і тими ж самимі мікроорганізмами, але за наявності заліза в поживному середовищі.

В роботі висвітлено технологію виробництва нового препарату на основі багреміцинів, що виділено з *Streptomyces* sp. Tii 4128. Даний біологічний агент синтезує 2 багреміцини – А і В які мають високу антибіотичну активність проти *Bacillus subtilis* та метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA). Хоча, *B. subtilis* не вважається патогенним, нещодавні дані показують, що він також може бути причиною бактеріємії, як і MRSA.

Бактеріємія – це не страшне захворювання, але при нехтуванні і відсутності нормального лікування, воно може призвести до гірших патологічних станів. *B. subtilis* може бути причиною гнійних менінгітів, а також бактеріємії, на рівні з MRSA. Штами *B. subtilis*, як і штами MRSA, вже набули резистентності до низки антибіотичних препаратів, а тому, є потреба у розробці нових антибіотиків.

Було запропоновано створення нового комбінованого препарату на основі багреміцину А та В для лікування бактеріємії. Розраховано кількість препарату, яку необхідно синтезувати для забезпечення потреб 2% населення, що потребує ліків проти бактеріємії. На рік, необхідна кількість багреміцинів становить 1,21 кг субстанції. За одну серію отримується близько 67 г.

Робота складається з вступу, 12 розділів та списку літератури, що містить 198 джерел. В роботі наведено 18 таблиць та 27 рисунків. Кількість сторінок – 170 Графічна частина містить технологічну та апаратурну схему, накреслені на аркушах формату А1.

Ключові слова: антибіотики, антибіотикорезистентність, бактеріємія, грампозитивні бактерії, багреміцини, *Streptomyces* sp. Tii 4128.

ABSTRACT

The work is devoted to new antibiotics called bagremycins. According to the literature review, intermediate metabolites that directly affect the synthesis of this group of antibiotics were identified, namely para-coumaric acid and 3-amino-4-hydroxybenzoic acid. The closest antibiotic in structure to bagremycins are ferroverdins, which are synthesized under the same conditions and by the same microorganisms, but in the presence of iron in the nutrient medium.

The paper highlights the production technology of a new drug based on bagremycins isolated from *Streptomyces* sp. Tii 4128. This biological agent synthesizes 2 bagremycins - A and B, which have high antibiotic activity against *Bacillus subtilis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Although *B. subtilis* is not considered pathogenic, recent evidence suggests that it may also cause bacteremia, as does MRSA.

Bacteremia is not a terrible disease, but with neglect and lack of normal treatment, it can lead to worse pathological conditions. *B. subtilis* can cause purulent meningitis, as well as bacteremia, on a par with MRSA. *B. subtilis* strains, like MRSA strains, have already acquired resistance to a number of antibiotic drugs, and therefore there is a need for the development of new antibiotics.

It was proposed to create a new combined drug based on bagremycin A and B for the treatment of bacteremia. The amount of the drug that needs to be synthesized to meet the needs of 2% of the population that needs drugs against bacteremia is calculated. For a year, the required amount of bagremycin is 1.21 kg of substance. About 67 g is obtained in one batch.

The work consists of an introduction, 12 chapters and a bibliography containing 198 sources. The work contains 18 tables and 27 figures. The number of pages is - 170 The graphic part contains technological and hardware diagrams drawn on A1 sheets.

Key words: antibiotics, antibiotic resistance, bacteremia, gram-positive bacteria, bagremycins, *Streptomyces* sp. Tii 4128.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Промислове застосування речовин, синтезованих представниками роду <i>Streptomyces</i>	11
РОЗДІЛ 2. Особливості мікробного біосинтезу метаболітів багреміцинової природи при культивуванні стрептоміцетів.....	23
2.1. Біосинтез пара-кумарової кислоти	23
2.2. Отримання 3-аміно-4-гідроксибензойної кислоти.....	26
2.3. Одержання феровердину.....	35
2.4. Новітні антибіотики групи багреміцинів	39
ВИСНОВКИ ДО ЛІТЕРАТУРНОГО ОГЛЯДУ	41
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва багреміцинів для лікарського засобу	42
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі багреміцинів, галузей використання, потреби у лікарському засобі.....	42
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	47
3.2.1. Обґрунтування форми випуску багреміцинів.....	47
3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки багреміцинів.....	55
3.3. Вибір біологічного агента для синтезу багреміцинів	63
3.4. Розрахунок потреби у багреміцинах для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції	68
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування стадій виділення і очищення багреміцинів	74
4.1. Обґрунтування стадії відокремлення біомаси та супернатанту.....	76
4.2. Обґрунтування розчинів для екстракції супернатанту та біомаси.....	77
4.3. Обґрунтування методу сушіння екстрактів багреміцинів	79

4.4. Обґрунтування розчиннику недочищених багреміцинів.....	80
4.5. Обґрунтування аніоніту для нанесення розчину багреміцинів	81
4.6. Обґрунтування розчину для елюції багреміцинів	82
4.7. Обґрунтування сушіння очищених багреміцинів	82
4.8. Обґрунтування регенерації використаних розчинів.....	83
РОЗДІЛ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях... ..	84
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання для одержання багреміцинів	88
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення багреміцинів для одержання лікарського засобу.....	93
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва багреміцинів для лікарського засобу	99
8.1. Вимірювання концентрації гідроксиду натрію.....	99
8.2. Вимірювання градусуметанолу.....	100
8.3. Контроль ваги кінцевої продукції.....	100
8.4. Контроль вологості кінцевої продукції.....	101
8.5. Контроль концентрації багреміцинів	101
РОЗДІЛ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми лікарського засобу на основі багреміцинів	104
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу проти бактеріємії на основі багреміцинів та кількості серій на рік	104
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря.....	105
9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря.....	105
9.2.2. Підготовка персоналу.....	107
9.2.2. Вибір дезінфікуючих засобів	110

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки... ..	114
9.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	115
9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання	118
РОЗДІЛ 10. Специфікація обладнання виробництва ін'єкційного препарату на основі багреміцинів	122
РОЗДІЛ 11. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти бактеріємії	125
РОЗДІЛ 12. Опис ін'єкційного препарату на основі багреміцинів згідно АНД	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	138

ВСТУП

Антибіотикорезистентність — здатність мікробів протистояти антибіотикам. Для захисту від дії антибіотиків бактерії можуть змінювати свої внутрішні структури, ховати молекули-мішені для препаратів, створювати помпи для викачування ліків геть з клітини або синтезувати ферменти, які ці ліки розщеплюють. Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків прийнято поділяти на природну і набуту. Природна стійкість пояснюється відсутністю у мікроорганізму мішені для дії антибіотика і є характеристикою виду мікроорганізмів. Набута резистентність є характеристикою окремого штаму. Вона виникає в результаті спонтанних мутацій чи набуття генів стійкості [1].

Причинами поширення стійкості до антибактерійних засобів вважають: необґрунтоване та надмірне використання антибіотиків у медицині, недотримання курсу лікування, надмірне використання антибіотиків у тваринництві та рибництві, неналежний інфекційний контроль у лікувальних закладах за поширенням резистентних штамів, повільна розробка нових генерацій антибіотиків [1].

Наприкінці 80-х років ХХ століття було знайдено близько 10 нових антибіотиків. І так кожні чотири роки, аж до 1999 року з'являлися приблизно 10 нових антибіотиків. На початку ХХІ століття кількість нових антибіотиків невпинно зменшувалась. І вже у 2009 році це число скоротилось до трьох. На сьогоднішній день кількість щорічно винайдених антибіотиків несуттєво зросла, але все одно цього недостатньо [1].

Якщо не пробувати вирішити цю проблему, то вже в 2050 році від повністю контрольованих раніше інфекцій буде померати щонайменше 10 мільйонів населення, що в 17 разів більше, ніж сьогодні. Можливо, звичайна пневмонія стане чумою, і забере життя великої кількості населення планети

					НУХТ БТЕК 02.02.4 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Вергун Ю.В.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						10	170
Реценз.								10
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Затверд.	Стабніков В.П.							

Земля, так як усі штами стануть резистентними до старих антибіотиків, а нових антибіотиків ще не винайдуть. Це виглядає дуже правдиво, беручи до уваги безконтрольне танеобдумане вживання даних препаратів людством [1].

Пошук і розробка нових антибіотиків – процес тривалий, кропіткий і дорогий. У ході подібних досліджень вивчаються й відбраковуються сотні, а то й тисячі культур мікроорганізмів. Одночасно виявляються все нові збудники інфекційних хвороб, а спектр активності існуючих препаратів стає недостатнім для боротьби з ними. Стрімко росте резистентність бактерій. Тому, поряд з пошуком природних антибіотиків, активно ведуться роботи з вивчення структури існуючих речовин, для того, щоб модифікуючи їх, одержувати нові й нові, більш ефективні й безпечні препарати. Модифікація існуючих антибіотиків з метою одержання нових напівсинтетичних речовин – гарна ідея, яка допомагає вирішити питання тут і зараз. Але, оскільки ці речовини побудовані на базі вже відомих та доволі вживаних речовин, до них буде дуже швидко розвиватись нова стійкість [2].

Основним джерелом генетичної інформації в бактеріальній клітині є хромосома, яка в більшості випадків утворена єдиною замкнутою циркуляторною молекулою ДНК. Гени, які в ній містяться забезпечують життєдіяльність бактерії практично в будь-яких обставин. У той же час, в багатьох (можливо, що і у всіх) бактеріях є додаткові молекули ДНК, що отримали назву плазмід. За розміром вони менші хромосомної ДНК, не пов'язані з нею і зазвичай відтворюються окремо від неї [2].

Гени, які переносяться плазмідами, найчастіше не є життєво необхідними для виживання бактерій в звичайних умовах, але можуть надавати клітинам носіям переваги в боротьбі за існування в деяких особливих обставинах. Третім джерелом генетичної інформації в бактеріальній клітині є бактеріофаги (або просто – фаги). Бактеріофаги – це віруси, які заражають бактерії. Більшість фагів здатні атакувати невелике число штамів певних бактерій, тобто мають вузьке і дуже специфічне коло потенційних жертв [2].

Наявність перерахованих механізмів передачі генетичної інформації означає, що не тільки мутації і селекція визначають еволюцію бактерій.

Наприклад, раніше чутлива до антибіотиків бактерія може при кон'югації придбати плазмиду, що містить гени, що кодують резистентність до декількох різних антибіотиків. У результаті протягом короткого проміжку часу в даній екологічній ніші може сформуватися пул полірезистентних мікроорганізмів [2].

Найбільш важливим з цих механізмів є руйнування антибіотика бактеріальними клітинами (мікроорганізми здатні виділяти ферменти, які руйнують антибіотик). Прикладом цьому служить розвиток резистентності до β -лактамних антибіотиків, які широко застосовуються в клінічній практиці. Також бактеріальні клітини можуть виділяти ферменти, які модифікують антибіотик. У результаті цього антибіотик втрачає можливість зв'язуватися зі своїми мішенями в бактеріальній клітині і втрачає свою ефективність. Прикладом служить розвиток резистентності до аміноглікозидів у грамнегативних бактерій родини *Enterobacteriaceae*, коли антибіотики інактивуються в результаті ацетилювання, аденілірування або фосфорилування [2].

Резистентність може розвиватися, коли змінюється мішень для дії антибіотика. Прикладом цього виду стійкості може бути резистентність *S. pneumoniae* до пеніциліну. Також, стійкість може розвиватися при порушенні проникності бактерій для антибіотиків. Наприклад β -лактамні антибіотики проникають в грамнегативні бактерії через пори за допомогою дифузії. Зменшення числа або радіуса пор призводить до зниження чутливості бактерій до цих антибіотиків [2].

Незважаючи на зростання резистентності до антибіотиків і зміни програм розробки ліків у приватному секторі, ринок антибіотиків залишається сильним.^{3, 4} У 2018 році FDA (Food and Drug Administration) схвалила чотири нові антибіотики з традиційних класів антибіотиків, включаючи аміноглікозид плазоміцин і тетрацикліни еравациклін, омадациклін і сарециклін. Ці нові антибіотики отримали схвалення, зокрема, завдяки подоланню встановлених клінічних механізмів резистентності для задоволення клінічних потреб [3].

Багреміцин А і багреміцин В, виділені з *Streptomyces* sp. Tü 4128 мають активність проти грампозитивних бактерій, грибків, а також мають слабку

протипухлинну активність, що робить їх великим потенціалом для розробки нових антибіотиків [4]. Дані сполуки виявляють високу активність проти *Arthrobacter aurescens*, *S. viridochromogenes*, *Bacillus subtilis* та MRSA [5].

Якщо з MRSA потужна боротьба ведеться ще 80-х років, то *B. subtilis* вважається непатогенним мікроорганізмом роду *Bacillus* і поширеним забруднювачем лабораторії. Проте, є інформація, стосовно того, що ці бактерії викликають інфекцію центральної нервової системи, головним чином у формі гнійного менінгіту. Як правило таке зараження відбувається у випадках прямої інокуляції через травму або ятрогенно [6]. Також, *B. subtilis* іноді можуть бути причиною бактеріємії/септицемії (як і MRSA), ендокардиту та інфекціями ран, ух, очей, дихальних шляхів, сечовивідних шляхів і шлунково-кишкового тракту [7]. Також, нерідко штами *B. subtilis* викликають харчові отруєння [8].

Для лікування бактеріємії спричиненою грам-позитивними бактеріями раніше використовували 3 антибіотики - пеніцилін, клоксацилін та еритроміцин [9]. Проте, штами *Bacillus* та MRSA стійкі до ряду кількох антибіотиків, таких як хлорамфенікол, тетрациклін, еритроміцин, лінкоміцин, пеніцилін і стрептоміцин [10]. Тому, багреміцини А та В можуть стати гарною альтернативою для лікування такого захворювання, оскільки це нові речовини, до яких ще немає резистентності.

Тому, актуальністю теми є застосування нових антибіотиків для подолання антибіотикорезистентності грампозитивних бактерій, які викликають низку різноманітних захворювань у людини.

Новизною теми є біотехнологічних синтез багреміцинів А та В за допомогою *Streptomyces* sp. Тіі 4128 з подальшою розробкою комплексного антибіотику для лікування бактеріємії [5].

РОЗДІЛ 1
ПРОМИСЛОВЕ ЗАСТОСУВАННЯ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ
ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДУ *STREPTOMYCES*

Streptomyces — це грампозитивні нитчасті бактерії, що належать до групи актиноміцетів, групи, яка охоплює більшість видів ґрунтових бактерій. Вони є всюдисущими ґрунтовими бактеріями, які також зустрічаються в морському середовищі, наприклад у донних відкладах [11].

Продукція багатьох вторинних метаболітів, включаючи антибіотики, поєднується з морфологічною диференціацією. Спостерігається більша

14

					НУХТ БТЕК 02.02.4 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вергун Ю.В.			Розділ 1. ПРОМИСЛОВЕ ЗАСТОСУВАННЯ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ ПРЕДСТАВНИКАМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					10	170
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

продукція вторинних метаболітів під час переходу від вегетативного до повітряного росту. Під час цієї зміни типу росту відбувається частковий лізис міцелію, щоб забезпечити необхідні поживні речовини для створення повітряного міцелію. Ця особливість циклу розвитку та виробництва вторинних метаболітів може бути способом для бактерій конкурентоспроможності, щоб зберегти ці поживні речовини, або вбити навколишні бактерії [11].

Приблизно дві третини природних антибіотиків були виділені з актиноміцетів, і близько 75% з них належать до роду *Streptomyces*. Є інформація, що *Streptomyces* виробляють близько 7600 біоактивних сполук. Це призвело до того, що біологічні агенти цього роду стали основними виробниками антибіотиків, які використовуються для виробництва вже відомих та нових ліків у фармацевтичній промисловості [12].

Пошуки антибактеріальних засобів із *Streptomyces* фактично почалися з початку 1940-х років. Результати досліджень Селманом А. привели до виділення першого антибіотика, позначеного як актиноміцин, специфічного бактеріостатичного та бактерицидного засобу, що виробляється *S. antibiotikus* (раніше відомий як *Actinomyces antibioticus*). Через кілька років вже був відкритий стрептоміцин, який використовувався як ліки від багатьох хвороб. Стрептоміцин був першим відкритим антибіотиком широкого спектру дії для ефективного лікування туберкульозу, викликаного *Mycobacterium tuberculosis* – смертельно небезпечним збудником. Стрептоміцин був отриманий з *S. griseus*, перших *Streptomyces*, які були використані для промислового виробництва цього протитуберкульозного препарату [13].

Зрештою вчені активізували пошуки антибіотиків із *Streptomyces*. Таким чином, стрептоміцети стали продуцентами понад 75% комерційно цінних антибіотиків, які застосовуються в медицині для людини та ветеринарії. Існує велика кількість ізноманітних антибіотиків, що належать до різних класів, які можуть бути отримані за допомогою *Streptomyces*, наприклад: клавуланова кислота (клас: β -лактам) із *S. clavuligerus*, неоміцин (клас: аміноглікозид) із *S. fradiae*, ванкоміцин (клас: глікопептид) із *S. orientalis*, і тетрациклін (клас: тетрациклін) із

S. aureofaciens [13].

Стрептоміцети невпинно демонструють свою роль у відкритті та розробці ліків. Нещодавно професор Сатоші Омура та професор Вільям Сесіл Кемпбелл отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини у 2015 році за успішне відкриття авермектину (який пізніше хімічно модифікований до івермектину) з *S. avermitilis*. Авермектин - сильний антигельмінтний засіб, ефективний проти багатьох нематод, павукоподібних і комах. Напівсинтетичне похідне івермектин є ефективним засобом лікування онхоцеркозу (річкової сліпоты) та лімфатичного філяріату (слоновості) у людини. На сьогоднішній день дослідники все ще активно шукають біологічно активні штами *Streptomyces* у всьому світі через їхній величезний потенціал у виробництві ефективних препаратів, і багато зусиль було докладено для подальшого вивчення потенціалу цих організмів у виробництві інших клінічно важливих сполук (приклади: протипухлинні, антиоксидант тощо) на додаток до антибіотиків [13].

Для кращого розуміння біосинтезувальних можливостей обраних актинобактерій, таблиці 1.1. показано біологічно-активні речовини, які можуть синтезувати різні види стрептоміцетів.

Приклади деяких клінічно та економічно важливих речовини з видів *Streptomyces*

Речовина	Тип	Продуцент	Місце виділення	Джерело
Білафос	Гербіцид	<i>S. hygroscopicus</i>	Острів Пасхи, ґрунт	[14,15]
Блеоміцин	Протираковий	<i>S. verticillus</i>	Ґрунт, вугільна шахта	
Хлорамфенікол	Антибіотик	<i>S. venezuelae</i>	Земля та компост	
Цінероміцин А+В	Пригнічує диференціювання адипоцитів клітин 3Т3-L1 через фактори Крюппеля 2 і 3	<i>S. cinerochromogenes</i>	Ґрунт кладовища Тама, Токіо, Японія	
Клавуланова кислота	інгібітор β-лактамаз	<i>S. clavuligerus</i>	Зразок ґрунту Південної Америки	
Кліндаміцин	Антибіотик	<i>S. lincolnensis</i>	Лінкольн, штат Невада, США	
Лінкоміцин	Антибіотик проти мікоплазм та актиноміцетів			
Даптоміцин	Ліпопептидний антибіотик	<i>S. roseosporus</i>	Гора Арарат, Туреччина	
Еритроміцин	Антибіотик	<i>S. erythraeus</i>	Ґрунт, Філіппіни	
Фосфоміцин	Антибіотик широкого спектру дії проти інфекцій сечовивідних шляхів	<i>S. fradiae</i>	Ґрунт, гора Монто, Іспанія	
Івермектин	Протипаразитарний, протионхоцеркозний та протилімфатичний філяріатоз	<i>S. avermitilis</i>	Японське поле для гольфу	
Канаміцин	Антибіотик	<i>S. kanamyceticus</i>	Ґрунт, Нагано, Японія	
Неоміцин	Антибіотик	<i>S. fradiae</i> і <i>S. albogriseus</i>	Ґрунт	
Ністатин	Противіробковий	<i>S. noursei</i>	Садова земля	
Рапаміцин	Противіробковий, протипухлинний імунодепресант	<i>S. hygroscopicus</i>	Острів Пасхи, ґрунт	
Сафраміцин(и) А, В, С, D і E	Протираковий	<i>S. lavendulae</i> subsp. <i>grasseri</i>	Кладовище Тама, Токіо, Японія	

Стрептоміцин	Антибіотик проти туберкульозу, холери, бубонної чуми	<i>S. griseus</i>	Компостний гній, Rutgers Farm, Нью-Йорк, США	[14,15]
Тетрациклін	Антибіотик	<i>S. aureofaciens</i> і <i>S. rimosus</i>	Пасовища Тімоті, Санборн Філд, Університет Міссурі, США	
Ванкоміцин	Антибіотик	<i>S. orientalis</i> (тепер називається <i>Amycolatopsis orientalis</i>)	Бруд Борнео	
Кабоксаміцин	Антибактеріальний, протигрибковий, протипухлинний	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	Донні відкладення Атлантики	[15,16]
Аммосаміди	Цитотоксичний	<i>Streptomyces</i> sp. CNR-698	Відкладення поруч Багам	
Спіроіндиміцини		<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 03032	Осад Індійського океану	
Індоміцини		<i>Streptomyces</i> sp. XZHG99 T	Кольорова пустеля	
Грінкаміцини		<i>S. lusitanus</i> SCSIO LR32	Південно-Китайське море	
Лобофорини E і F	Цитотоксичний, антибактеріальний	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 01127		
Лобофорини H і I	Антибактеріальний	<i>Streptomyces</i> sp. 12A35		
Марфурахіноцини	Цитотоксичний, антибактеріальний	<i>S. niveus</i> SCSIO 3406		
Марангуцикліни A і B		<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 11594		
Атратуміцин	Протитуберкульозний	<i>S. atratus</i> SCSIO ZH16		
Дезотаміди B–D	Антибактеріальний	<i>S. scopuliridis</i> SCSIO ZJ46		
Сунгсанпін	Інгібіторна активність до A549 за допомогою аналізу клітинної інвазії	<i>Streptomyces</i> sp. SNJ013	Острів Чеджу	
Ахпатін	Інгібітори аспарагінової протеази	<i>Streptomyces</i> sp. ACT232	Затока Сагамі	
Фрадіаміни A і B	Антибактеріальний	<i>S. fradiae</i> MM456M-mF7		

Лобофорин К	Цитотоксичний	<i>Streptomyces</i> sp. M-207	Центральне Кантабрійське море	[15,16]
Похідне 3-гідроксихінальдієвої кислоти		<i>S. cyaneofuscatus</i> M-157		
Антрациміцин В	Антибактеріальний	<i>S. cyaneofuscatus</i> M-169	Атакама	
Чаксалактини		<i>Streptomyces</i> sp. C34		
Асенджонаміди		<i>S. asenjonii</i> KNN 42.f		
Атакаміцин	Інгібітор ферментів, антипроліферативний	<i>Streptomyces</i> sp. C38		
Абенкіни	Інгібітор ферменту фосфодіестерази типу 4b	<i>Streptomyces</i> sp. DB634		
Чаксапептин	Інгібуюча активність в аналізі клітинної інвазії з A549	<i>S. leeuwenhoekii</i> C58		
2-аміно-N-(2-аміно-3-фенілпропаноіл)-N-гідрокси-3-фенілпропанамід	Антимікробний	<i>Streptomyces</i> WAB9	Сахара	
Піридин-2,5-діацетамід	Антибактеріальний	<i>Streptomyces</i> sp. DA3-7	Арабська пустеля	
2-аміно-3-додеканол, норофтальмова кислота, ефір фталевої кислоти		<i>S. avidinii</i> SB9	Арктика	
Арктикозид, С-1027 хромофор-V	Цитотоксичний	<i>Streptomyces</i> sp. ART5		
Омюнгсамицини А і В	Цитотоксичний, антибактеріальний	<i>Streptomyces</i> sp. SNJ042	Корейський вулкан	
Уллендін	Пригнічує інвазію та міграцію карциноми легенів людини A549	<i>Streptomyces</i> sp. KCB13F003		

Близько 80% клінічно використовуваних антибіотиків походять з актинобактерій, у яких значна кількість із них виділена з роду *Streptomyces*. Багато вторинних метаболітів цього роду мають велике медичне значення. Було виявлено, що івермектин, протипаразитарний засіб, отриманий із *S. avermitilis* для лікування лімфатичного філяріатозу, має потужний пригнічуючий ефект на ріст вірусу, що викликає грізну коронавірусну хворобу 2019 (COVID-19) (SARS-CoV-2). Крім того, стрептоміцети також визнані продуцентами протигрибкових, протипухлинних/протиракових, антиоксидантних і противірусних агентів [17].

Важливою проблемою, яку можуть вирішити метаболіти стрептоміцетів, є поширення та стійкість метицилінрезистентний золотистий стафілокок (MRSA). Ці мікроорганізми становлять значну загрозу для здоров'я, оскільки вони, як правило, викликають серйозні інфекції у вразливих груп населення і їх важко лікувати через обмежений спектр ефективних антибіотиків, а також їх здатність утворювати біоплівку. Колись ці мікроорганізми були обмежені інфекціями, отриманими в лікарнях, але зараз широко присутні в суспільстві та навіть у тварин. Крім того, ці організми постійно розвиваються, щоб виробити стійкість до нових антибіотиків [15,18,19].

Низка полікетидів від стрептоміцетів є потенційними агентами в боротьбі з MRSA. До прикладів таких сполук можна віднести: полікетоміцин, геліквіноміцин, гризеузін А та 4'-деацетил гризеузін А, цитреаміцин θ А та θ В, хаксаміцин Д. Полікетоміцин синтезується *S. coelicolor* та має мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) проти MRSA 0,025-0,2 мкг/мл. Вихід цієї сполуки за допомогою вищезазначеного продуцента в середньому становить 4,3 г/л. Наразі точного механізму дії полікетоміцину невідомо, але даний препарат відноситься до антрациклінових антибіотиків, тому вчені роблять припущення щодо інгібування ДНК-полімерази, що притаманно для представників протипухлинних антимікробних речовин. Геліквіноміцин синтезує *Streptomyces* sp. MJ929. Він пригнічує геліказу

ДНК людини, відому мішень для росту пухлин, а його МІК щодо MRSA становить 0,05-0,1 мкг/мл. Гризеузин А та 4'-деацетилгризеузин належать до антибіотиків гризеузину та демонструють активність проти MRSA 1 та 0,5 мкг/мл відповідно. Ці речовини синтезує *S. griseus* M33-5. Гризеузини також відомі своїми сильними протираковими властивостями і зазвичай зустрічаються серед актиноміцетів, зокрема *Streptomyces* і *Nocardiosis* sp., а також гриби. Наприклад, гризеузини раніше були виділені з *S. griseus* K-63, 3-5, *S. griseus* MJ361-48F3, *Streptomyces* sp. IFM 11307, штам актиноміцетів MJ932-SF3, *Nocardiosis* sp. і *Penicillium* sp.. Цитреаміцин θ А належить до групи цитреаміцинових ксантонових антибіотиків, які вперше було виділено з *Micromonospora citrea*. Усі препарати цієї групи демонстрували активність проти MRSA, причому цитреаміцин η був найпотужнішою сполукою проти MRSA з МІК <0,015 мкг/мл. Цитреаміцин θ А та θ В нещодавно було одержано з *S. caelestis*. Вони показали потужну анти-MRSA активність при МІК 0,25 мкг/мл. Хаксаміцин Д виділено з *Streptomyces* sp. С34. Полікетид належить до групи сполук ансаміцину, до якої також входить потужний протитуберкульозний препарат рифаміцин. МІК хаксаміцину Д становив 2 мкг/мл, а рифампіцину значення варіювалися від 0,002 до 4 мкг/мл [15,18].

Також, варто виділити нерибосомальні пептиди, які також можуть використовуватись у боротьбі з MRSA. Нозігептид був виділений із *Streptomyces* sp. CNT 373. Цей інгібітор синтезу білка мав швидку бактерицидну дію протягом перших 6 годин і постантибіотичний ефект понад 9 годин. Крім того, його рівень МІК залишався незмінним у присутності 20% сироватки, що свідчить про те, що він може бути перспективним у клінічних умовах. Механізм дії нозігептиду тісно пов'язаний з тіострептоном, який діє на 50S рибосоми. Нозігептид уже довів свою ефективність на тваринних моделях (20 мг/кг) на мишах, за допомогою якої лікували внутрішньоочеревинний MRSA. Нозокоміцини А, В, С і D були виділені з *Streptomyces* sp. K04-0144. МІК щодо MRSA для нозокоміцинів А-D становив 0,125

мкг/мл, тоді як для ванкоміцину та іміпенему становили 0,5 та 16 мкг/мл відповідно. Моеноміцини, до яких відносяться нозокоміцини, мають великий терапевтичний потенціал, оскільки дослідження показали, що для досягнення більшого терапевтичного ефекту необхідно націлюватися на активний центр ферменту, що їх активним механізмом дії. На сьогоднішній день не існує фармакокінетичних досліджень для визначення його потенціалу в терапії людини – моеноміцини наразі використовуються лише у ветеринарних установах. Нещодавно було виділено марінопіроли з активністю проти MRSA з облігатних морських *Streptomyces* sp. CNQ-418. Вони виявляють потужну анти-MRSA активність з МІК <1 мкг/мл. Марінопірол С продемонстрував МІК при 0,16 мкг/мл, а марінопірол А мав МІК 0,31 мкг/мл [15,18].

Виробництво різноманітних хімічних сполук широкого спектру дії, як продемонстровано *Streptomyces*, має перевагу утворення потенційних антагоністичних та антимікробних сполук, які можуть бути цінними як пробіотики. Здатність виробляти антагоністичні сполуки може допомогти пробіотикам конкурувати за поживні речовини та місця прикріплення в хазяїні. Було визначено, що *Streptomyces* sp. можуть продукувати сидерофори, які можуть впливати на ріст патогенних *Vibrio* sp. через конкуренцію за залізо у водному середовищі. Вважається, що пробіотики зі здатністю виробляти сидерофори витісняють патогени, обмежуючи біодоступність заліза та призводячи до ослаблення росту патогенів, оскільки залізо є необхідним для росту. Крім того, *Streptomyces* утворює інгібіторні сполуки та метаболіти, що беруть участь у послабленні утворення біоплівки, мають антикворумну сенсорну активність та антивірусну активність у *Vibrio* sp., а також виявляє противірусну активність, зокрема проти вірусу синдрому білої плями [20,21].

Таблиця 1.2. демонструє можливості застосування різних видів *Streptomyces* як потенційних пробіотиків через їх особливості (наприклад, синтез певних речовин або

Пробіотичні та інші можливі ефекти, що демонструються бактеріями *Streptomyces* через різні механізми дії [20]

Особливості/ Механізм дії	Пробіотичні бактерії <i>Streptomyces</i>	Результати
Синтез сидерофорів	<i>S. cinerogriseus</i> A03 і A05 <i>S. griseorubroviolaceus</i> A26 і A42 <i>S. lavendulae</i> A41 <i>S. roseosporus</i> A45 <i>S. griseofuscus</i> B15	<ul style="list-style-type: none"> Усі штами, позитивні щодо продукції сидерофора, виявлені за допомогою CAS-агару Виявлена антагоністична активність щодо досліджуваних видів вібріонів (<i>V. harveyi</i>, <i>V. nereis</i>, <i>V. fluvialis</i>, <i>V. alginolyticus</i>, <i>V. parahaemolyticus</i>, <i>V. vulnificus</i> і <i>V. anguillarum</i>) в діапазоні від <10 мм до >30 мм зон інгібування Штами, що продукують сидерофори, контролюють збудників <i>Vibrio</i>, конкуруючи за залізо в морському середовищі.
Антибіоплівкова та антикворумна сенсорна активність	<i>S. albus</i> A66	<ul style="list-style-type: none"> Послаблює утворення біоплівки <i>V. harveyi</i> зі ступенем інгібування 99,3% при 2,5% (об./об.) Диспергує зрілу біоплівку <i>V. harveyi</i> зі швидкістю розкладання 75,6% при 2,5% (об./об.) Антибіоплівкова активність пояснюється деградацією кворум-чутливого фактора N-AHSL (N-ацильований гомосерин лактон)
Антивірусна активність	<i>Streptomyces</i> sp. K01-0509	Продукував гуадіномін В, інгібітор секретійної системи III типу грамнегативних бактерій, включаючи <i>Vibrio</i> sp., з ІК ₅₀ при 14 нМ
	<i>Streptomyces</i> sp. AJ8	Внутрішньом'язове введення етилацетатного екстракту вторинного метаболіту значно зменшило вірусне навантаження синдрому білої плями (85%) у <i>Fenneropenaeus indicus</i> після третього дня ін'єкції.
Секреція екзоферменту	<i>Streptomyces</i> CLS-28 <i>Streptomyces</i> CLS-39 <i>Streptomyces</i> CLS-45	<ul style="list-style-type: none"> Усі штами показали хорошу протеолітичну активність та різну амілолітичну та ліполітичну активності Пропонується для полегшення використання корму та травлення господаря, що призводить до збільшення ваги <i>Penaeus monodon</i> при включенні в корм

Закінчення табл.1.2.

Ефект прискорення росту	<i>S. fradiae</i> і <i>Streptomyces</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> • Покращений ріст післяличинкових креветок <i>P. monodon</i> і декоративних риб <i>Xiphophorus helleri</i> • Виробляє гормон, що стимулює ріст, індолоцтову кислоту, яка посилює ріст <i>X. helleri</i>
Толерантність до низького рН і стійкість до кишкових ферментів	<i>Streptomyces</i> sp. JD9	<ul style="list-style-type: none"> • Показав відмінну життєздатність при рН 2 • Виявлена стійкість до пепсину при 3 мг/мл, жовчі при 0,3% і панкреатину при 1 мг/мл • Продемонстровано хорошу живучість у шлунково-кишкових умовах
Поліпшення якості води	<i>Streptomyces fradiae</i> <i>Streptomyces</i> sp. <i>Streptomyces</i> CLS-28	<ul style="list-style-type: none"> • Знижений рівень аміаку у воді • Збільшення загальної кількості гетеротрофних бактерій у воді, що сприяло прискоренню розкладання відходів
Одноклітинний білок	<i>Streptomyces</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> • Використовується як джерело білка для хазяїна, підвищує швидкість перетворення їжі та ефективність перетворення їжі, покращує продуктивність росту
Дослідження <i>in vivo</i>	<i>Streptomyces</i> CLS-28 <i>Streptomyces</i> CLS-39 <i>Streptomyces</i> CLS-45	<ul style="list-style-type: none"> • <i>V. harveyi</i> при 10^6 КУО/мл знищив усі <i>Artemia nauplii</i> за 72 год. • Додавання штамів <i>Streptomyces</i> [у 1% (об'єм/об'єм)] збільшило виживаність <i>A. nauplii</i> на 67% і дорослих особин на 61% після 72-годинного впливу <i>V. harveyi</i> при 10^6 КУО/мл. Захист <i>P. monodon</i> проти <i>V. harveyi</i> • <i>V. harveyi</i> при 10^7 КУО/мл знищив 55% <i>P. monodon</i> після 5 днів впливу • <i>Streptomyces</i> CLS-28, включений у корм, збільшив виживаність <i>P. monodon</i> на 67% порівняно з контролем за 5 днів експозиції.

стійкість/толерантність до умов росту, що притаманно пробіотикам) або ж механізм дії (антибактеріальна, противірусна).

Багреміцини є бактеріальними вторинними метаболітами і належать до фенольних ефірів, утворених з п-гідроксистиролу та п-гідроксибензойної кислоти. Перші два багреміцини А і В, з ґрунтового актиноміцета *Streptomyces* sp. Tü 4128, були зареєстровані в 2001 році. А з нещодавніх досліджень відомо про три нових багреміцини С–Е з актиноміцета *Streptomyces* sp., отриманого з мангрових дерев. Q22. Обидва багреміцини А і В показують антибактеріальну активність проти *Arthrobacter aurescens* DSM20166 і *S. viridochromogenes* Tü 57 [22]. Раніше багреміцин А був описаний як речовина, що синтезується з пара-кумарової кислоти та 3-аміно-4-гідроксибензойної кислоти, що продукуються *Streptomyces* spp. Нещодавно було виявлено, що він активний проти грамполозитивних бактерій, таких як *Bacillus subtilis*, *A. aurescens*, як це було згадано раніше, але слабо активний проти *Saccharomyces cerevisiae* та *Candida albicans*. Протипухлинної активності цього антибіотика не спостерігалось. Повідомляється, що синтезувати даний метаболіт також може інший актиноміцет - *Nocardia caishijiensis*. Екстракт цього агента володіє такими ж самими властивостями, що й багреміцин А, а при аналізі ВЕРХ було виявлено співпадіння з цією речовиною на 99,2% [23]. Нові аналоги багреміцину F і G з прибережної бактерії *Streptomyces* sp. ZZ745 мали антимікробну активність проти MRSA ATCC 43300 (116,2–176,5 мкМ) [24].

Наразі відомо, що багреміцини продукуються видами *Streptomyces* sp. Tü 4128, *Streptomyces* sp. Q22, *Streptomyces* sp. ZZ745 і *S. lunaelactis* MM109T. Окрім антибактеріальної та протигрибкової активності, багреміцини С і F мають протиракову активність [25]. За загальними спостереженнями, багреміцини синтезуються продуцентом в умовах обмеження заліза в поживному середовищі. Коли є надлишок заліза, аміногрупа багреміцину замінюється нітрозогрупою з

утворенням феровердину, сидерофора, який використовується як антихолестеринний препарат [26,27].

Гліоми — це пухлини головного мозку, які походять із нейрогліальних клітин-попередників. Звичайні методи лікування, включаючи хірургічне втручання, хіміотерапію та променеву терапію, досягли обмежених покращень у прогнозі пацієнтів з гліомою [28]. Результати показали, що багреміцин С активний проти чотирьох різних клітинних ліній гліоми зі значеннями IC_{50} (концентрація напівмаксимального інгібування) у діапазоні від 2,2 до 6,4 мкМ (72 години) порівняно з активністю доксорубіцину (0,4-3,3 мкМ). Багреміцин В також продемонстрував подібну активність зі значеннями IC_{50} від 7,3 до 13,3 мкМ [22,29].

Таблиця 1.3.

Порівняння активності багреміцинів та доксорубіцину щодо клітинних ліній гліоми [29]

Речовина	IC_{50} , мкМ			
	U87MG	U251	SHG44	C6
Багреміцин В	10,2 ± 0,5	9,7 ± 1,9	7,3 ± 0,8	13,3 ± 2,4
Багреміцин С	2,2 ± 0,1	4,3 ± 0,4	2,4 ± 0,2	6,4 ± 0,5
Доксорубіцин	0,4 ± 0,0	3,3 ± 0,7	1,9 ± 0,0	0,5 ± 0,1

РОЗДІЛ 2

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОГО БІОСИНТЕЗУ МЕТАБОЛІТІВ БАГРЕМІЦІНОВОЇ ПРИРОДИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ СТРЕПТОМІЦЕТІВ

2.1. Біосинтез пара-кумарової кислоти

Пара-кумарова кислота також називається *p*-гідроксикоричною кислотою, *p*-кумаровою кислотою та *p*-НСА [30].

Загальним хімічним шляхом синтезу *p*-гідроксикоричних кислот (*p*-НСА) є конденсація Кневенагеля-Дьобнера, що каталізується основами, між малоновою кислотою та відповідним альдегідом (рис.2.1.). Звичайна процедура включає піридин як розчинник і каталізатор. Однак інший амін (наприклад, анілін, піперидин) часто додають для підвищення реакційної здатності. Тим не менш, вже з'явилися більш екологічні стратегії для здійснення цієї реакції [31].

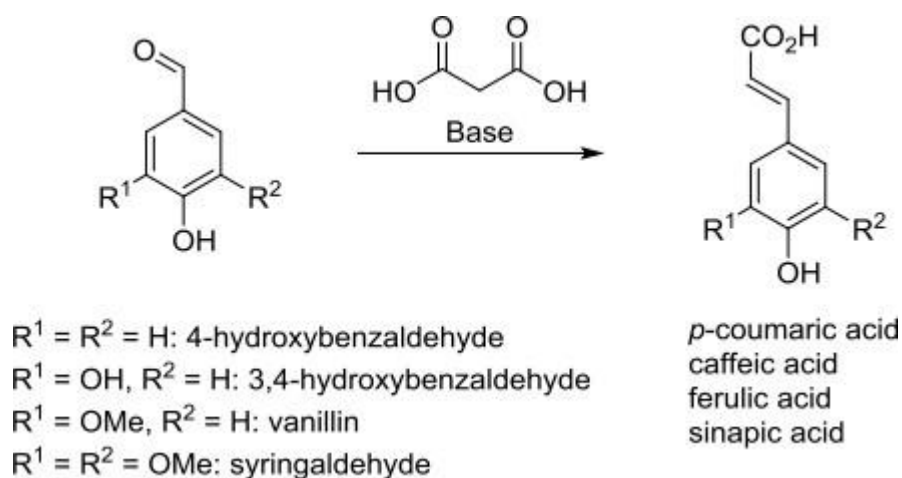


Рис.2.1. Реакція Кневенагеля-Дьобнера для одержання *p*-НСА [31]

p-Гідроксикоричні кислоти є рослинними вторинними метаболітами, отриманими з ароматичних амінокислот, *L*-фенілаланіну та *L*-тирозину в фенілпропаноїдному шляху. Хоча цей шлях не існує в природі в мікробних штаммах, що використовуються в промисловості (наприклад, *Escherichia coli* та

<i>НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ</i>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Вергун Ю.В.			
Перевір.	Буценко Л.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 2 ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОГО БІОСИНТЕЗУ МЕТАБОЛІТІВ БАГРЕМІЦІНОВОЇ ПРИРОДИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ СТРЕПТОМІЦЕТІВ				
		Лім.	Арк.	Аркушів
			23	138
<i>Кафедра БТМ</i>				

Saccharomyces cerevisiae), він може бути реалізований шляхом гетерологічної експресії генів, що кодують ферменти [31].

За допомогою шикіматного шляху мікроорганізми здатні виробляти L-фенілаланін і L-тирозин, попередники р-НСА із цукрів. Було проведено багато роботи над переналаштуванням потоку вуглецю на виробництво цих попередників. Робота в основному стосується надлишкової експресії ключових генів у метаболізмі, знищення конкурентного шляху (тобто шляху Ерліха), усунення ферментів і регуляції транскрипції [31].

Сучасні дослідження продемонстрували необхідність екстенсивних адаптацій у гліколізі, пентозофосфатному шляху та метаболізмі шикімату, щоб створити штучний шлях пара-кумарової кислоти з тирозину та фенілаланіну [32]. На прикладі дріжджової системи було створено приклад штучного синтезу пара-кумарової кислоти. Для кращого розуміння потрібно спиратися на рис.2.2 [30].

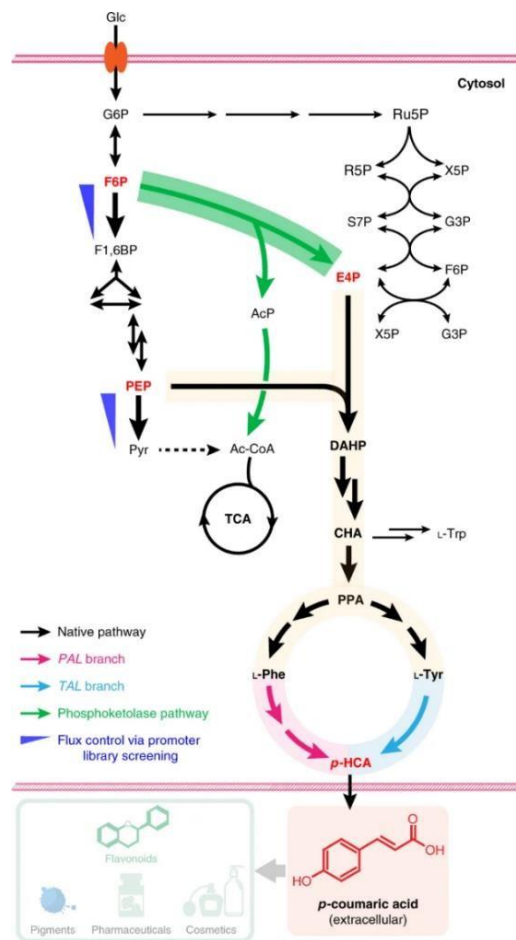


Рис.2.2. Штучний синтез пара-кумарової кислоти в дріжджовій системі

[30]

Шифри: Glc - глюкоза, G6P - глюкозо-6-фосфат, F6P - фруктозо-6-фосфат, F1,6BP - фруктоза 1,6-біфосфат, G3P - гліцеральдегід 3-фосфат, PEP - фосфоенолпіруват, Pyg - піруват, AcP - ацетилфосфат, Ac-CoA - ацетил-CoA, TCA - цикл трикарбонових кислот, Ru5P - рибулозо-5-фосфат, R5P - рибозо-5-фосфат, X5P - ксилулозо-5-фосфат, S7P - 7-фосфат седогептулози, E4P - еритрозо-4-фосфат, DANP - 3-дезоксид-D-арабіно-2-гептулозонова кислота 7-фосфат, CNA - хоризмова кислота, PPA - префенат, L-Phe - L-фенілаланін, L-Tyr - L-тирозин, L-Trp - L-триптофан, p-HCA - p-кумарова кислота [30].

Синтез розпочинається з глюкози. Важливими речовинами при гліколізі є глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат та фосфоенолпіруват. Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозо-фосфатного шляху, що допомагає синтезувати еритрозо-4-фосфат. Ця ж речовина синтезується з фруктозо-6-фосфату за допомогою фосфокетолази (EC 4.1.2.22) (зелені стрілки), перенаправляючи гліколітичний потік на синтез зазначеної проміжної речовини. Також, у цьому шляху фігурує фосфотрансацетилаза, яка перетворює ацетилфосфат в ацетил-CoA, який запускає цикл трикарбонових кислот. Фенілаланін та тирозин вважаються основними субстратами для синтезу p-HCA. Амінокислоти синтезуються через шляхи синтезу шикімату та ароматичних амінокислот. До рожевих стрілок відносяться ферменти фенілаланін-аміачної ліази та гідроксилаза коричної кислоти. До синього шляху відноситься тирозинова аміачна ліаза. Подальша оптимізація розподілу вуглецю між гліколізом і шляхом біосинтезу ароматичних амінокислот була досягнута шляхом налаштування гліколітичного потоку фосфотрансфруктокінази та піруваткінази (блакитні трикутники) за допомогою комбінованого скринінгу промоторів (PFK1, PFK2, та PYK1) [30].

Дослідження показали, що p-гідроксикоричні кислоти виявляють такі терапевтичні властивості, як протипухлинні, антидіабетичні, протизапальні і запобігають тромбозам і нейродегенеративним захворюванням. Вони також можуть служити прекурсорами для молекул з високою цінністю, таких як ванілін, мономери, полімерні добавки проти ультрафіолетового випромінювання та

антиоксиданти, що робить їх дуже привабливі на ринках лікарських засобів, косметики або продуктів харчування/кормів, які постійно зростають [31].

Крім розробки потоку вуглецю, було докладено великих зусиль для отримання гетерологічного p-СА (пара-кумарової кислоти) з різними мікроорганізмами, оскільки це перший p-НСА в біосинтетичному шляху [31]. У 2015 році максимальне виробництво було досягнуто Nijkamp та ін. у сконструйованому *Pseudomonas putida*, бактерію, стійку до розчинників, з 1,74 г/л p-СА при періодичному культивуванні з контрольованим введенням L-фенілаланіну [31]. Після цього, зі сконструйованим *S. cerevisiae*, Rodriguez та інші дали кінцевий титр 1,93 г/л p-СА під час ферментації в чашках з підживленням із D-глюкозою як субстратом. Це покращення відбулося завдяки їхній інженерній роботі над шляхом синтезу шикімату [33]. Найсвіжішою роботою з цього питання є робота Liu, який серед інших працював над пентозофосфатним шляхом, щоб збільшити пул еритрозо-4-фосфату. За допомогою своєї стратегії та періодичної ферментації з підживленням було синтезовано 12,5 г л⁻¹ p-СА, використовуючи сконструйований штам *S. cerevisiae* [30,34].

Інші недавні роботи з цього приводу, хоч і не досягли високої продуктивності, проте видаються цікавими. Vorja та інші у 2019 році для біопродукції p-СА вибрали штам *S. cerevisiae*, здатний споживати D-ксилозу. Використовуючи це джерело вони отримали 45-кратне збільшення виробництва p-СА порівняно з контролем з D-глюкозою [35]. Gu та інші у 2020 році сконструювали штам *Yarrowia lipolytica* для отримання продуктів ароматичного походження. Вони отримали кінцеву концентрацію в 593,53 мг/л p-СА на D-глюкозі як субстрату [36].

Здебільшого p-СА синтезується рослинами, тому немає природнього мікроорганізму, який може її продукувати. Також, велику увагу при побудові рекомбінанти щодо біосинтезу p-СА приділяють в першу чергу промотору, а вже потім плазміді [37].

В табл.2.1. показано рекомбінантні штами, які можуть синтезувати p-СА.

2.2. Отримання 3-аміно-4-гідроксибензойної кислоти

3-Аміно-4-гідроксибензойна кислота (3,4-АНВА) є метаболічним проміжним продуктом біосинтезу гриксазону в *S. griseus* і синтезується за допомогою ферментів GriI та GriH, які кодуються *griI* та *griH* відповідно. GriI каталізує реакцію альдольної конденсації між L-аспартат-4-напівальдегідом і дигідроксіацетонфосфатом, а GriH перетворює отриманий метаболіт C7 на 3,4-АНВА. Завдяки цій двостадійній реакції ці два ферменти можуть утворювати ароматичне кільце з C4 (L-аспартат-4-напівальдегід) і C3 (дигідроксіацетонфосфат) первинних метаболітів, тоді як більшість ароматичних сполук, включаючи ароматичні амінокислоти, утворюються в багатоетапному режимі реакції через шикіматний шлях. 3,4-АНВА служить попередником для полібензоксазолу, термостабільного біопластику, і його можна біосинтезувати з зброджуваних цукрів [48]. Багреміцини що представляють собою аміноароматичні антибіотики, що утворюються в результаті конденсації цієї самої 3-аміно-4 гідроксибензойної кислоти з півнілфенолом [49].

Рекомбінантний штам *Corynebacterium glutamicum*, що експресує гени *griH* і *griI*, успішно виробляє 3,4-АНВА з цукрів. Схема біотрансформації глюкози в 3,4-АНВА показано на рис.2.2. З даної схеми видно важливість проміжних продуктів гліколізу, а саме дигідроксіацетон фосфат (DHAP) та піровиноградної кислоти (Pyr), для синтезу 3,4-АНВА. З циклу трикарбонових кислот важливим попередником є оксалоацетат (ОХА), оскільки його надлишок впливає на синтез лізину (Lys), який є також важливим метаболітом синтезу 3,4-АНВА [50].

Однак необхідно визначити стратегії покращення виробництва 3,4-АНВА, включаючи метаболічну інженерію та біоінженерію. Концентрація розчиненого кисню (DO) є одним із найважливіших факторів, що визначають продуктивність процесу бродіння. На відміну від анаеробного бродіння органічних кислот, для утворення ароматичних сполук і амінокислот потрібен кисень, оскільки відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (NADPH), необхідний для синтезу, в основному постачається через окислювальний пентозофосфатний шлях (PPP; рис.2.2). Наприклад, виробництво аспартатних похідних L-лізину (Lys) і 1,5-діамінопентану було реалізовано при рівні $DO \geq 20\%$ насиченого

Рекомбінантні штами, що можуть синтезувати пара-кумарову кислоту

Біологічний агент	Промотори	Середовище для синтезу, г/л	Умови культивування	Концентрація пара-кумарової кислоти, г/л	Джерело
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>Pcp560</i>	NaNO ₃ – 1,5 K ₂ HPO ₄ – 0,04, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,074, CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,035,	Культивування з освітленням, 30 °С, 7 діб	0,131	[38]
	<i>PtrcCore</i>	Лимонна кислота×H ₂ O – 0,007, Цитрат заліза амонію – 0,01, Na ₂ EDTA×2H ₂ O – 0,001, Na ₂ CO ₃ – 0,02, Розчин мікроелементів – 1 (г/л): H ₃ BO ₃ – 2,86, MnCl ₂ ×4H ₂ O – 1,81, ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,22, Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O – 0,39, CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,079, Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O – 0,05	Культивування з освітленням, 30 °С, 320 об/хв, 4 доби	0,4	[39]
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>ARO2</i>	Дріжджова азотна основа без амінокислот і з сульфатом амонію – 6,7, Глюкоза – 20	30 °С, 220 об/хв, 60 годин	0,0213	[40]
<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>ARO4, ARO7</i>	Дріжджовий екстракт – 3, Пептон – 10, Глюкоза - 20	30 °С, 350-900 об/хв, рН 6, 72 год	0,223	[41]
<i>S. cerevisiae</i> CEN. PK102-5		Дріжджова азотна основа без амінокислот і з сульфатом амонію – 6,7, Глюкоза – 20	30 °С, 250 об/хв, 72 год	1,937±0,26	[33]
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>TAL1, ENO2, ARO1, ARO4^{K229L}, ARO7^{G141S}</i>	Дріжджова азотна основа без гістидину – 6,7, Глюкоза – 20	30 °С, 200 об/хв, 120 год	0,02	[42]

<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>ARO7^{G141S}</i> , <i>ARO4^{K229}</i>	Глюкоза – 40 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 5, KH ₂ PO ₄ – 3, MgSO ₄ ×7H ₂ O - 0,5, EDTA – 0,01, ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,0045, CoC ₂ ×6H ₂ O -0,0003 MnCl ₂ ×4H ₂ O 0,001, CuSO ₄ ×6H ₂ O - 0,0003, CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,0045, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,003, NaMoO ₄ ×2H ₂ O - 0,0004 мг, H ₂ BO ₄ – 0,001, KI - 0,0001, Силіконовий піогасник - 0,025 мл	30 °С, 250 об/хв, рН 5, 72 год	2,018 ± 0,000	[43]
<i>S. cerevisiae</i> CEN. PK102-5				2,405 ± 0,054	
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>ARO3</i>	Дріжджовий екстракт – 10, Пептон – 20, Глюкоза - 40	30 °С, 250 об/хв, 96 год	0,098	[44]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>T7</i>	Триптон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, Лактоза – 0,34	37 °С, 200 об/хв, 24 год	2,1	[45]
		Триптон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, ПТГ – 0,048, Ампіцилін – 0Ю1	37 °С, 180 об/хв, 10 год	0,525	[46]
	<i>RgTAL</i>	Триптон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, Стрептоміцин – 0,04, ПТГ – 0,096	28 °С, 220 об/хв, 24 год	0,28	[47]

кисню для регенерації NADPH. Крім того, ароматичні сполуки шикімату та його похідних були отримані при $DO \geq 10\%$ рівня насиченого кисню в культурі з використанням *E. coli* та *C. glutamicum* [50].

При метаболізмі глюкози для синтезу 1 моль 3,4-АНВА потрібно 2 моль NADPH, а для синтезу 1 моль Lys – 4 моль NADPH. У *C. glutamicum* надходження NADPH переважно залежить від окисного PPP, а збільшення потоку покращує вихід Lys. Це свідчить про те, що зменшене надходження NADPH при обмеженні кисню може спрямувати більше вуглецю з Lys до 3,4-АНВА [50].

3,4-АНВА можна виробляти шляхом ферментації, використовуючи крафт-целюлозу як вихідний матеріал [34]. Крафт-целюлоза, яку відновлюють процесами фракціонування в паперовій промисловості, є прикладом модельної целюлозної сировини, на додаток до деревини, енергетичних культур і сільськогосподарських відходів. Крафт-целюлозу гідролізують для досягнення високої концентрації глюкози в гідролізаті. Після 72 годин інкубації більша частина крафт-целюлози розріджується, утворюючи темно-коричневий супернатант, що містить 60–80 г/л глюкози. Штам *C. glutamicum* KT01 може продукувати 3,4-АНВА в середовищі мінеральної солі, що містить гідролізат крафт-целюлози як єдине джерело вуглецю ($\approx 65\%$ об./об., 37,7 г/л глюкози). У цьому середовищі ріст клітин зменшився на 40%, але виробництво 3,4-АНВА збільшилося в чотири рази порівняно з контрольним середовищем. Концентрація 3,4-АНВА, отриманого з біомаси, досягла $3,1 \pm 0,2$ г/л після 215 годин культивування [51].

Нерідко 3,4-АНВА можна одержати за допомогою екстрактів рослин. Наприклад, *Origanum ehrenbergii* Voiss, широко використовується в кулінарії як спеція. Проте, з даної рослини можна одержати 3,4-АНВА. Зі 100 г висушеної маси рослини вдалося одержати 1,4 мг на г екстракту 3,4-АНВА. Це означає, що в 100 г ця кількість становитиме 140 мг [52].

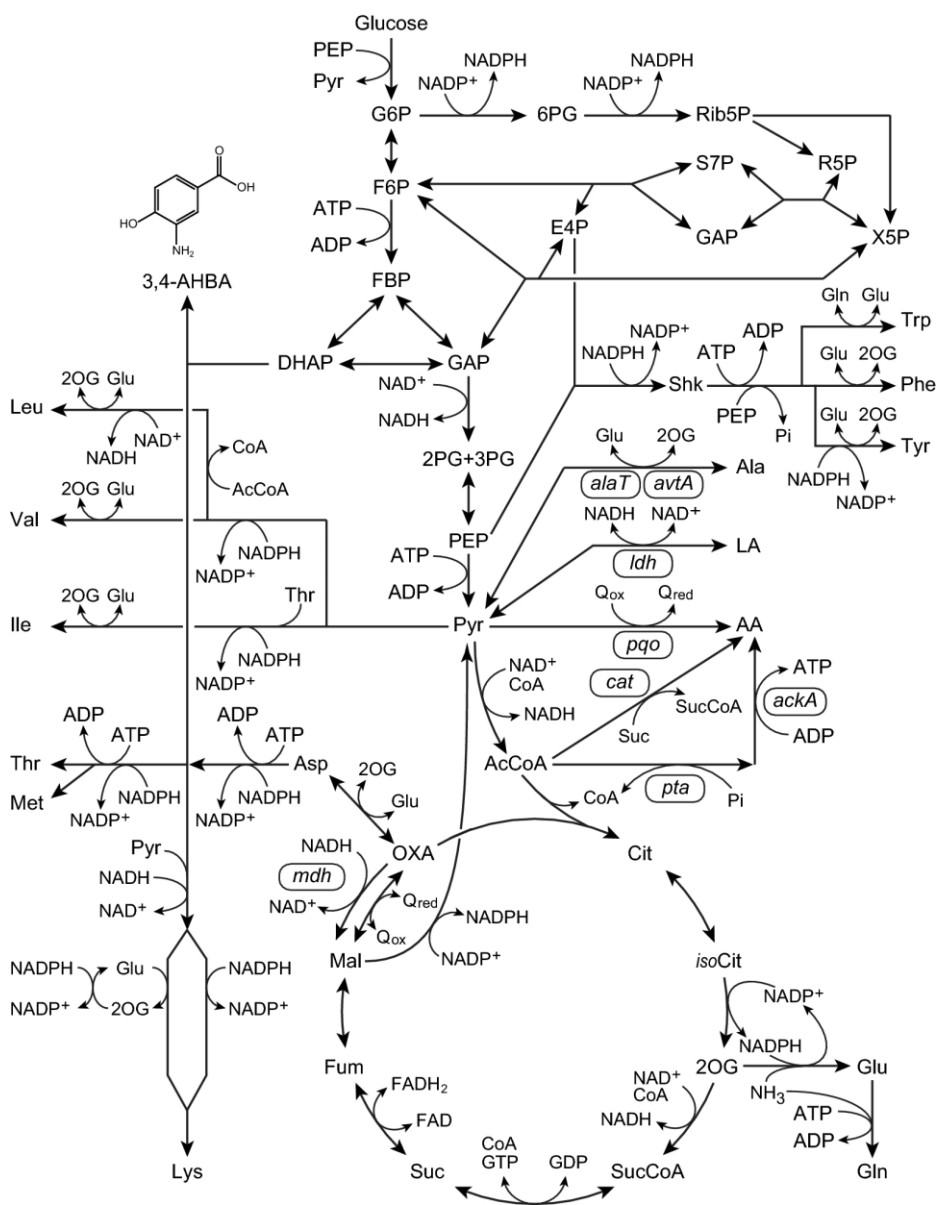


Рис.2.3. Схема біотрансформації глюкози в 3,4-АНВА [50]

Попередником 3-аміно-4-гідроксибензоату може бути 4-гідроксибензоат, популярний харчовий консервант з протимікробною, протизапальною та антиоксидантною дією. 3,4-АНВА також виявляє антиоксидантну та протизапальну активність [53].

Таблиця 2.2. показує рекомбінантні штами, що синтезують 3,4-АНВА.

До синтезу потенційного попереднику здатний рекомбінанта *P. taiwanensis* VLB120. Гени, що кодують шлях виробництва 4-гідроксибензоату посилюють

надмірної експресію тих білків, що кодують ключові ферменти шляху шикімату. Важливою мутацією є обмеження синтезу триптофану, для більшого виходу бажаного попереднику. Таку маніпуляцію виконують за допомогою блокування шляхів деградації для 4-гідроксибензоату, 4-гідроксифенілпірувату та 3-дегідрошикімату. Гліцерин виявився найкращим джерелом карбону для одержання 4-гідроксибензоату. Концентрація ароматичної сполуки на 80 годині культивування становила $72,0 \pm 0,96$ мМ, що еквівалентно 9,9 г/л [55].

Подібне дослідження проводили щодо рекомбінантних штамів *E. coli*. Щоб підвищити ендогенний біосинтез 4-гідроксибензоату, ген нативної хоризматпіруватліази (*ubiC*) був надмірно експресований. При цьому, утворився рекомбінантний штам N74dpheA. На 24 годині культивування кількість 4-гідроксибензоату становила 89 ± 5 мг/л, а вже на 72 годині - 269 ± 1 мг/л. Кінцеву концентрацію було визначено на 96 годині, яка становила 277 ± 2 мг/л [56].

Відмічається важливість оксидоредуктази щодо впливу на синтез 4-гідроксибензоату. Даний фермент підвищує синтез окисно-відновних еквівалентів, особливо NADPH, який є важливим компонентом синтезу 3,4-АНВА. Використовуючи M9 мінімальне середовище з глюкозою, а також блокуючи гліколітичний шлях, ведучи біотрансформацію за пентозо-фосфатним шляхом, вдається одержати немалу кількість 4-гідроксибензоату. *E. coli* MX203 за 60 годин культивування синтезував 250 ± 40 мкМ 4-гідроксибензоату (0,034 г/л), а його 2 рекомбінанти - DA015 та DA016 - 47 ± 7 (0,0065 г/л) та 140 ± 40 мкМ (0,019 г/л) відповідно [57].

Рекомбінантний штам *C. glutamicum* ATCC13032 також здатний до синтезу 4-гідроксибензоату. Для його конструювання використовується принцип, як і в роботі Lenzen. При цьому, експресують гени синтезу шикімат кінази. За 65 годин культивування кількість 4-гідроксибензоату становила 19,0 г/л (137,6 мМ). Це вкотре

Рекомбінантні штами, що можуть синтезувати 3,4-АНВА

Біологічний агент	Вектор	Середовище для синтезу, г/л	Умови культивування	Концентрація 3,4-АНВА, г/л	Джерело
<i>S. glutamicum</i> ATCC 21799	<i>Aldh</i>	Глюкоза – 40, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 20, Морфолінопропансульфонова кислота (MOPS) – 42, KH ₂ PO ₄ – 1, K ₂ HPO ₄ – 1, CaCl ₂ – 0,001 MgSO ₄ – 0,001, Біотин - 0,001, Лейцин – 0,1, Пантотенова кислота – 0,1, Хлорамфенікол – 0,005	26 °С, рН 7, 200 об/хв, витрата повітря 0,5 л/об'єм, 228 год	5,6	[50]
	<i>pCACgriHI</i>	Сік сорго – до концентрації загального цукру 40 г/л Сечовина - 5, (NH ₄) ₂ SO ₄ - 20, KH ₂ PO ₄ - 1, K ₂ HPO ₄ - 1, MOPS - 42, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,25, CaCl ₂ – 0,01, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01, MnSO ₄ ×H ₂ O – 0,01, ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,001, CuSO ₄ ×5H ₂ O – 0,00031, NiCl ₄ ×6H ₂ O – 0,000002, Біотин – 0,0002, Протокатехова кислота – 0,00003 L-гомосерин – 0,5	30 °С, рН 7, 180 об/хв, 72 год	1	[48]

<i>C. glutamicum</i> KT01	містить <i>griH</i> і похідні <i>griI</i>	Гідролізат крафт-целюлози – 650 (містить 37,7 г/л глюкози), (NH ₄) ₂ SO ₄ – 20, Морфолінопропансульфонова кислота (MOPS) – 42, KH ₂ PO ₄ – 1, K ₂ HPO ₄ – 1, CaCl ₂ – 0,001 MgSO ₄ – 0,001, Біотин - 0,001, Лейцин – 0,1, Пантотенова кислота – 0,1, Хлорамфенікол – 0,005	26 °C, pH 7, 200 об/хв, витрата повітря 0,5 л/об'єм, 215 год	3,1 ± 0,2	[51]
<i>S. lividans</i> 1326 (NBRC 15675)	<i>pUC702-pro-griH</i>	Ксилоза - 50 Триптон – 37, Сойтон – 3, NaCl – 5, K ₂ HPO ₄ – 2,5 Тіострептон – 0,005,	28 °C, pH 7,2, 190 об/хв, 96 год	2,7	[54]

каже про важливість шляху синтезу шикімату для одержання як 4-гідроксибензоату, так і 3,4-АНВА [58].

2.3. Одержання феровердину

Феровердини (рис.2.4), разом з антибіотиками віридоміцинами та актиновердинами, є зелено-пігментованими комплексами іонів двовалентного заліза (заліза(II)) (Fe^{2+})-нітрозофенолато, що утворюються декількома представниками роду *Streptomyces*. Феровердини А, В і С спочатку були виділені з культуральної рідини *Streptomyces* WK-5344 і пізніше ідентифіковані як основні сполуки, що виробляються видами *S. lunaelactis* [59].

Умова для внутрішньоклітинного накопичення феровердинів стрептоміцетами контрастує з умовою, яка сприяє секреції сидерофорів. У той час як виробництво сидерофорів запускається при виснаженні заліза, виробництво феровердину натомість активується при перевантаженні залізом. Фізіологічна роль феровердинів для мікроорганізмів-продуцентів на даний момент невідома [59].

Синтез феровердинів також є унікальною особливістю, оскільки він залежить від кластера біосинтетичних генів (*fev/bag*), також залучених у виробництво аміноароматичних антибіотиків, званих багреміцинами. Як вже зазначалося, багреміцини утворюються в результаті конденсації ароматичних сполук за допомогою

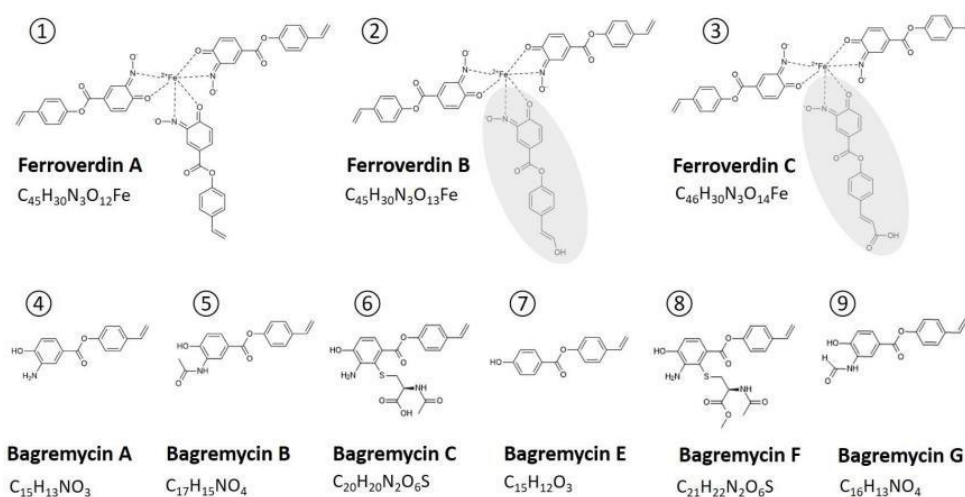


Рис.2.4. Структурні формули феровердинів та багреміципнів [59]

багреміцинсинтетази FevW/BagE. Відмінність синтезу між феровердинами полягає у кількості заліза (рис.2.4, рис.2.5). Таким чином, кластер *bag/fev* є унікальним прикладом біосинтетичного генного кластера, який бере участь у виробництві двох структурно різноманітних молекул з різною біоактивністю [59].

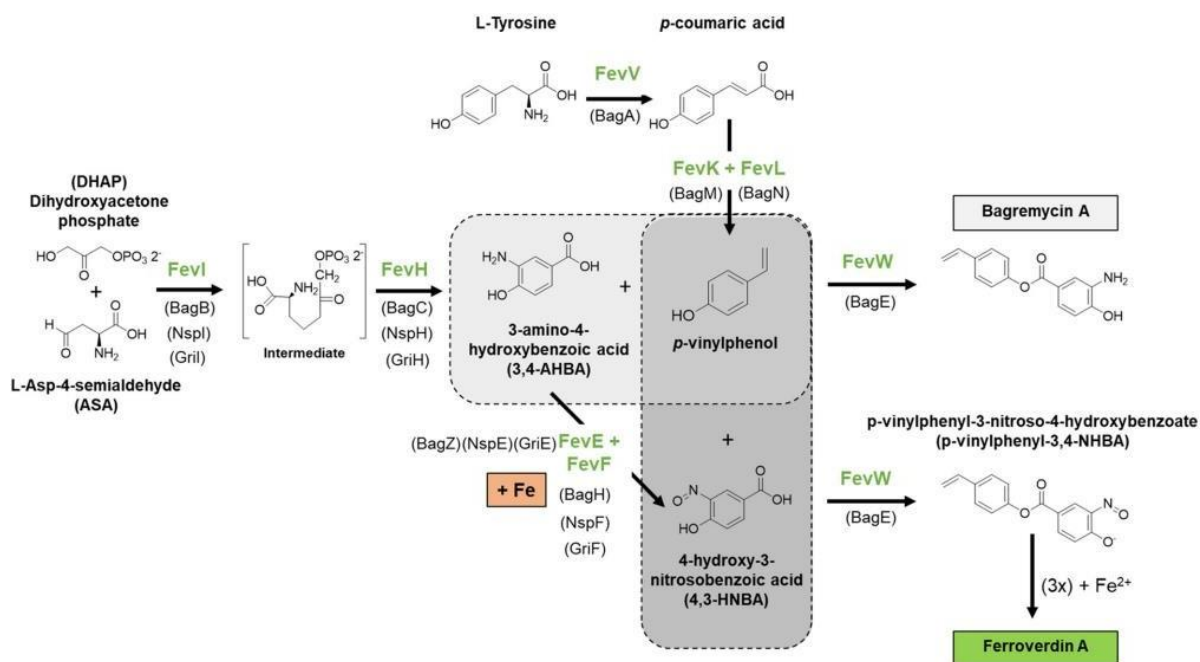


Рис.2.5. Відмінність синтезу феровердину та багреміцину [49]

Феровердини відомі як потужні інгібітори людського білка-переносника ефіру холестерину (СЕТР). СЕТР переносить ефіри холестерину з неатерогенних ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) до потенційно проатерогенних фракцій ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ). Таким чином, інгібітори СЕТР підвищують концентрацію холестерину ЛПВЩ і знижують концентрацію холестерину ЛПНЩ, що, за прогнозами, знижує ризик серцево-судинних захворювань. Виявлення інгібіторів СЕТР для підвищення рівня холестерину ЛПВЩ все ще розглядається як можлива стратегія зменшення серцево-судинних подій, незважаючи на те, що три сполуки феровердинів зазнали невдачі у фазі III клінічних випробувань [59].

Феровердини - це сімейство зелених пігментів, які зустрічаються не лише в *S. lunaelactis*. Наприклад, 4-гідрокси-3-нітрозобензоат (деферровіридоміцин) і віридоміцин виробляються *S. viridans*. Ці нітрузофеноли є хелаторами, які використовуються для отримання заліза або кобальту бактеріями, а деякі феровердини навіть виявляють слабку антибіотичну активність [60].

Біосинтетичні дослідження щодо генів синтезу було виконано для 4-гідрокси-3-нітрозобензаміду (4,3-HNBAm), феровердину, що продукується *S. murayamaensis*. Вироджені праймери, спрямовані на 3,4-АНВА були використані для ідентифікації передбачуваного кластера біосинтетичних генів феровердину. Гетерологічна експресія в *S. lividans* пов'язувала кластер генів із продукуванням. У кластері генів феровердину NspF було ідентифіковано як передбачувану N-оксигеназу на основі гомології послідовності з *GriF* (ідентичність 70%), тирозиназоподібною монооксигеназою, яка окислює о-амінофенол до о-хіноніміну у біосинтезі гриксазону А. Кластер генів nsp також містить гомолог *GriE* (NspE), транспортного білка, який полегшує включення міді іонів в активний центр монооксигенази GriF. Варто зауважити, що саме ці ферменти є важливими для синтезу 3,4-АНВА, а отже й для синтезу багреміцинів та феровердинів. Тож, можна зробити очевидний висновок щодо зв'язку шляхів синтезу цих речовин [60].

4-Гідрокси-3-нітрозобензамід можна одержувати не лише шляхом біосинтезу стрептоміцетів, а й з екстрактів рослин. Джерелом одержання цього феровердину може слугувати мох *Chaetomorpha crassa*. З нього було виділено цей агент та виявлено антимікробну, протизапальну та протипухлинну активність 4-гідрокси-3-нітрозобензаміду, що може бути корисним у складі косметики для шкіри [61].

Феровердин має споріднені речовини, такі як віридоміцин А, актиновіридин і віридоміцин Е. Ці комплекси спрямовані на певні бактерії, руйнуючи їх клітинні мембрани, однак вільні ліганди виявилися більш ефективними, ніж відповідні

комплекси заліза. Ці комплекси біосинтезуються за допомогою *Streptomyces* шляхом інкубації в двовалентному середовищі (наприклад, з FeSO₄) з джерелами вуглецю, такими як фруктоза та аланін [62]. В табл.2.3. показано продуценти феровердинів.

Біологічні агенти, що можуть синтезувати феровердини та їх похідні

Біологічний агент	Феровердин	Середовище для синтезу, г/л	Умови культивування	Концентрація продукту, г/л	Джерело
<i>S. lunaelactis</i> sp. nov. MM109 ^T	Феровердин А	Пептон - 5, Дріжджовий екстракт – 3	28 °С, рН 6, 5 днів	-	[63]
	Феровердин С2	Сахароза – 103, Глюкоза – 10, Казамінові кислоти – 0,1, K ₂ SO ₄ – 0,25, MgCl ₂ ·6H ₂ O – 10,12	28 °С, 16 год, 210 об/хв	10	[49]
<i>S. lunaelactis</i> , MM37	Феровердин С3	Розчин 10% дріжджового екстракт – 5, Розчин 0,5% КН ₂ РО ₄ – 1, Розчин 3,68% СаCl ₂ ×2H ₂ O – 8, Розчин 20% L-проліну – 1,5, Розчин 1 н NaOH – 0,5, FeCl ₃ – 0,16		0,01	[59]
	Феровердин D			0,01	
	Феровердин D2			0,016	
	Феровердин D3			0,017	
	Феровердин E			0,019	
	Феровердин E			0,007	
	Феровердин F			0,014	
	Феровердин G			0,015	
	Феровердин H			0,021	
	Феровердин CD			0,013	
	Феровердин DE			0,015	
Феровердин DF		0,014			
	Феровердин DG		0,012		
<i>S. lunaelactis</i> , MM91	Феровердин А			0,5	[49]
<i>S. tanashiensis</i> BYF-112	Віридоміцин	Крохмаль – 10, Дріжджовий екстракт – 1,5, KNO ₃ – 1, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,05	28 °С, 180 об/хв, 7 діб	0,25	[64]

Екстремальні та незвичайні екосистеми, такі як ізольовані стародавні печери, завжди розглядаються як потенційні інструменти для відкриття нових природних продуктів із біологічною активністю. Актинобактерії, які населяють ці незвичайні екосистеми, розглядаються як перспективне джерело для розробки нових ліків. Таким чином, було виділено низку штамів з антимікробною активністю, яку пояснюють синтезом феровердину А. Широкий спектр антимікробної дії було виявлено в ізоляті *Streptomyces* sp. IB 2014I88-4. Цей агент проявляв високу активність проти *B. subtilis*, *Staphylococcus carnosus*, *E. coli*, *P. putida*, *S. cerevisiae* та *C. albicans*. Аналізуючи попередню інформацію, можна припустити, що штам синтезує низку антимікробних речовин разом з феровердином, які в комплексі дають такі гарні результати антагоністичної активності [65].

2.4. Новітні антибіотики групи багреміцинів

Багреміцин А і В, виділені з *Streptomyces* sp. Tü 4128 — це два нові антибіотики, отримані з транскумарової кислоти, які демонструють широку біологічну активність, наприклад антибактеріальну, протигрибкову та протипухлинну дію. Багреміцин А виявляє активність проти грибкового збудника *C. albicans*, тоді як багреміцин В спрямований проти некротрофічного збудника *Botrytis cinerea*. Тому ці дві сполуки можуть бути корисними як у медицині, так і в сільському господарстві [66].

Багреміцин С, як це було згадано раніше, має сильну інгібіторну активність проти клітин гліюми. Нещодавно було виділено багреміцини F і G з штаму *Streptomyces* sp. ZZ745. Дані агенти оцінювали проти клітинних ліній гліюми людини U87-MG і U251, але вони не були активними проти обох клітинних ліній, навіть у концентрації 100 мкМ. Проте, дані речовини мають антимікробну активність проти *E. coli* зі значеннями МІК 41,8 і 61,7 мкМ відповідно [64].

Раніше було наведено, що штам *Streptomyces* sp. Tü 4128 може синтезувати шість різних багреміцинів (багреміцин від А до G), що виробляються й іншими видами. Окрім антибактеріальної та протигрибкової активності, багреміцини С і

F, які відрізняються від чотирьох інших багреміцинів наявністю N-ацетил-(S)-цистеїнової частини. Також, було виділено багрелактон А, який є макролідом, отриманим із багреміцину, виділеним із *Streptomyces* sp. Q22 [25].

Багреміцини мають різні найкращі продукційні штами, тобто MM83 для багреміцину А та багреміцину Е, MM113 для багреміцину В та багреміцину G та MM37 для багреміцину С та багреміцину F. Доступ до цих альтернативних штамів, що продукують багреміцин, також міг би вирішити проблеми, пов'язані із занадто низьким виходом продукції (або в деяких випадках сполука не вироблялася взагалі) і полегшити наступні етапи очищення. Наприклад, MM83 був би оптимальним штамом *S. lunaelactis* для використання для отримання всіх багреміциноподібних сполук. Натомість штам MM37 буде рекомендований для екстрактів, збагачених сульфованими багреміцинами С і F для використання в тестах протипухлинної активності. Типовий штам MM109T буде ідеальним для виробництва багрелактону [25].

ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ

1. Стрептоміцети – дуже цінні біологічні агенти, які синтезують велику кількість різноманітних вторинних метаболітів, починаючи пігментами, закінчуючи антибіотиками та протипухлинними препаратами. Ці мікроорганізми привертають до себе увагу через високу стійкість до різних несприятливих умов існування. Для підтримки своєї життєдіяльності ці агенти вимушені синтезувати різноманітні речовини, які можна застосовувати як в великій промисловості (харчовій, хімічній, аграрній і т.д.), так і в медицині.
2. Наразі великий інтерес складають саме нові антимікробні речовини. Такий пошук зумовлено погіршенням проблеми стійкості різних патогенів до вже відомих препаратів. Прикладом може бути метицилін-резистентний штам золотистого стафілококу, який раніше був лише клінічним збудником різних хвороб, а зараз все частіше зустрічається в навколишньому середовищі.
3. Стрептоміцети синтезують багреміцини. Це нові антибіотики, які мають антимікробну та протипухлинну активність. Наприклад, багреміцин С можна застосовувати проти деяких ліній клітин гліоми. Наразі, досліджень щодо синтезу багреміцинів не дуже багато, але з кожним роком їх стає все більше, а з цим, стає все більше нових антибіотиків і їх похідних, які відносяться до цієї групи.
4. Відомо, що багреміцини синтезуються шляхом конденсації 3-аміно-4-гідроксибензойної кислоти з півнілфенолом. Ключовими ферментами цієї реакції є багреміцинсинтетази FevW/BagE. Багреміцин утворюється через шикіматний шлях, але при біосинтезі цього антибіотику має бути відсутні катіони заліза, інакше утворюється пігмент – феровердин.
5. Для біосинтезу багреміцинів важлива наявність попередників, а саме р-кумарової кислоти, з якої утворюється півнілфенол та 3-аміно-4-гідроксибензойної кислоти, яка приймає участь в процесі конденсації для утворення зазначених антимікробних речовин. Стрептоміцети здатні до синтезу обох речовин, але в промисловому масштабі використовують різні рекомбінантні штами.

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА БАГРЕМІЦИНІВ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі багреміцинів, галузей використання, потреби у лікарському засобі

Багреміцин А та В – це нові антибіотики, які синтезуються за допомогою культивування *Streptomyces* sp. Тіі 4128. Дані антибіотики проявляють антимікробну активність щодо *A. aurescens*, *S. viridochromogenes*, *B. subtilis* та *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* (лише багреміцин А) [5].

Багреміцини є бактеріальними вторинними метаболітами і належать до фенольних ефірів, утворених з п-гідроксистирола та п-гідроксибензойної кислоти. Окрім цих речовин, ще відомо про багреміцини С–Е, виідлені з актиноміцета *Streptomyces* sp., отриманого з мангрових дерев Q22. Багреміцин С може інгібувати проліферацію різних клітинних ліній гліоми, викликає індукований апоптоз у клітинах гліоми людини U87-MG залежно від дози та часу; і зупинив клітинний цикл U87-MG на фазі G0/G1. Наразі визначено кілька генів, включаючи *bagA*, *bagB*, *bagC* і *bagI*, беруть участь у біосинтезі багреміцину [5].

Багреміцини А та В також мають протимікробну активність щодо штамів *Escherichia coli* та метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA). Концентрація багреміцину В МІК при цьому становить 73,9 та 110,9 мкМ відповідно. Для багреміцину А ці значення становлять 125,4 мкМ щодо обох патогенів. Подібними властивостями володіють багреміцин F та G. Багреміцини F і G також оцінювали проти клітинних ліній гліоми людини U87-MG і U251, проте за результатами досліджень вони не мали ніякого ефекту [5].

					НУХТ БТЕК 02.02.4 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вергун Ю.В.			Розділ 3. ТЕО виробництва багреміцинів для ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					48	170
Реценз.						Кафедра БТМ 48		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Повертаючись до багреміцинів А та В – вони мають високу антимікробнуактивність щодо *A. aureescens*. *Arthrobacter* spp. широко поширені в навколишньому середовищі, особливо в ґрунті, і нещодавно визнані умовно-патогенними. Наразі всього 5 видів *Arthrobacter* були виділені з клінічних джерел, а саме *A. albus*, *A. creatinolyticus*, *A. cumminsii*, *A. luteolus* і *A. woluwensis*. Крім того, деякі штами *A. oxydans* були виділені з крові людини [67]. Проте знання про поширення, патогенний потенціал і клінічне значення штамів *Arthrobacter* є наразі невідомо. Сучасні дослідження штамів *A. aureescens* показують їх можливе використання у ролі гербіцидів [68]. Проте, є інформація, що *A. aureescens* також є агенти інфекції сечовивідних шляхів [69]. Тому, потенційно, багреміцини А та В можна використовувати для лікування таких інфекцій. Ризик виникнення бактеріурії (наявність бактерій у сечі) знаходиться в межах 3-6 % на день. Інфекції сечовивідних шляхів являються найбільш частими бактеріальними інфекціями в амбулаторній практиці та займають 2-ге місце, уступаючи лише інфекціям дихальних шляхів. Згідно з статистичними даними у 50% жінок у світі хоча б один раз у житті зазначають епізод інфекцій сечовивідних шляхів, з них у 25-40% протягом 6-12 міс виникає рецидив захворювання. Кожний рік біля 10% жінок хворіють гострим циститом, а пієлонефрит залишається основною причиною госпіталізації під час вагітності за неакушерськими показаннями. Проте профілактичне застосування антибіотиків не є ефективним для послаблення симптомів інфекцій сечовивідних шляхів [70].

S. viridochromogenes – ґрунтовий актиноміцет, який також знайшов своє застосування у складі гербіцидів [71]. Штам Tü57 здатний до синтезу антибіотику – авіламіцину А [72]. Дані мікроорганізми відносяться до непатогенних мікроорганізмів, а тому навряд чи є сенс використовувати багреміцини для даного біологічного агента [73].

B. subtilis – цікаві біологічні агенти, які набули широкого поширення в біотехнології. Проте, вони не є цілком безпечними. Сучасні дослідження показують, що *B. subtilis* здатні викликати гнійний менінгіт та бактеріємію

[74,75].

Бактеріємія, у найточнішому сенсі, відноситься до життєздатних бактерій у крові. Безсимптомна бактеріємія може виникнути під час звичайних повсякденних дій, таких як проведення гігієни ротової порожнини та після незначних медичних процедур. У здорової людини ці клінічно доброякісні інфекції є мінущими та не викликають подальших наслідків. Однак, коли механізми імунної відповіді дають збій або перевантажуються, бактеріємія стає інфекцією кровотоку, яка може розвинути в багатьох клінічних спектрах і диференціюватись як септицемія. Бактеріємії, як і септицемії, наразі лікуються лише антибіотикотерапією [76].

Гнійний менінгіт - це бактеріальне ураження субарахноїдального простору. Це невідкладна діагностична та терапевтична ситуація. Лікування базується на лікуванні бактерицидними антибіотиками, яке спочатку призначається емпірично на основі основного захворювання, клінічного обстеження та епідеміологічного контексту, а потім коригується відповідно до мікроорганізму, виділеного зі спинномозкової рідини [77].

Рід *Bacillus* складається з різноманітних і всюдисущих грампозитивних видів, які здебільшого нешкідливі, однак деякі види демонструють патогенну здатність. *B. subtilis*, що передаються через їжу, є основними причинами харчових захворювань і, як повідомляється, відповідальні за приблизно 600 мільйонів випадків хвороб, що передаються через їжу, і 420 000 випадків смерті в усьому світі в 2010 році, згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я. *B. subtilis* псують харчові продукти, спричиняють захворювання, що передаються харчовим шляхом, і можуть виробляти токсини [8].

Штами вже мають резистентність до лінкоміцину, стрептограміну А, віргініаміцину М, хлорамфеніколу, тетрацикліну, еритроміцину, пеніциліну і стрептоміцину [10,78]. І цей список щороку лише збільшується. Тому, пошук нових антибіотиків для контролю цього патогену вже стає нагальною проблемою.

S. cerevisiae, *C. albicans* інгібуються лише багреміцином А. *S. cerevisiae* добре відомий у пекарській та пивоварній промисловості, а також використовується як пробіотик у людей. Однак це дуже рідкісна причина інфікування людей. Однак повідомлялося про важкі опортуністичні інфекції, спричинені *S. cerevisiae*, у пацієнтів із хронічними захворюваннями, раком та імуносупресією. Були описані фунгемія, ендокардит, пневмонія, перитоніт, інфекції сечовивідних шляхів, інфекції шкіри та езофагіт [79,80].

Фунгемія є найпоширенішою формою захворювання, викликаним дріжджами (особливо часто *Rhodotorula* spp.), яка може бути пов'язана з сепсисом і ураженням кінцевих органів. Також може статися поширення в інші органи, включаючи шкіру, печінку та сечовивідні шляхи. Це захворювання також може спровокувати гострий, підгострий або хронічний менінгоенцефаліт у пацієнтів з ослабленим імунітетом. Основним фактором ризику інфікування є наявність центрального венозного катетера у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями або реципієнтів трансплантації солідного органу чи гемопоетичних стовбурових клітин [81].

Дані нещодавніх досліджень показують, що звичайний штам дріжджів *S. cerevisiae*, може посилювати симптоми хвороби Крона. Хоча вся кишкова мікробіота відіграє важливу роль у здоров'ї людини, більшість досліджень зосереджено на популяції бактерій. Антитіла проти *S. cerevisiae*, різновиду дріжджів, виявлені у деяких пацієнтів із хворобою Крона, що свідчить про те, що штам бере участь у запальних захворюваннях кишечника. Через це, для лікування/профілактики цієї хвороби додатково вводять хворим пацієнтам антитіла до клітинної стінки пекарських дріжджів. Крім того, при хворобі Крона найбільш часто призначаються антибіотики метронідазол і ципрофлоксацин. Наразі вони ще ефективно діють, проте, оскільки кількість препаратів для лікування даної хвороби дуже обмежене, можна припустити, що скоро дані антибіотики також вироблять стійкість [82,83].

C. albicans - це тип дріжджів, який живе у тілі людини. Він може перерости та перетворитися на інфекцію, якщо баланс здорових бактерій та

дріжджів порушується. Кандидоз — це термін, який використовується для опису інфекції, викликаной надмірним ростом дріжджових грибків. Поширені інфекції включають вагінальні дріжджові інфекції, пелюшковий дерматит і молочницю [84].

Кандидоз порожнини рота – це захворювання, коли у роті та горлі утворюється ріст дріжджів, які виглядають як білі горбки. Вагінальна дріжджова інфекція (молочниця) – інфекція, коли дріжджі розмножуються всередині піхви та викликають інфекцію. Інші назви вагінальної дріжджової інфекції — «вагінальний кандидоз» або «кандидозний вагініт». Інвазивний кандидоз - це важка інфекція, яка вражає все тіло, зокрема кров, кістки, мозок і серце. В загальному лікуванні призначають протигрибковими препаратами, але в дуже важких випадках прописуються антибіотики широкого спектру [84].

Щодо ринку антибіотиків, в даний час серед постачальників медичних послуг високий попит на β -лактами та інгібітори β -лактамази. У 2017 році світовий ринок антибіотиків склав 42 335 мільйонів доларів США, і, за прогнозами, до 2025 року він досягне 50 374 мільйонів доларів, зростаючи на 2,1% CAGR (показник річного темпу зростання) з 2018 по 2025 рік [85].

Насправді, це дуже страшна тенденція, враховуючи, що в більшості патогенних бактерій вже набута стійкість до β -лактамних антибіотиків [86]. Щороку вони стають ще менш ефективними, але великі фармацевтичні корпорації не збираються зменшувати їх виробництво. Це може бути пов'язано з тим, що антибіотики за останні роки було доволі легко придбати в аптеках нашої країни. Хоча наразі всі антибіотичні препарати за законом можна придбати лише по рецепту, більшість фармацевтів в аптеці закривають на те очі, і продають ліки без рецепту. В Україні сильно розвинений культ самолікування, що також погіршує стан проблеми виникнення антибіотикорезистентності [87]. Навіть в англomовному Google можна з легкістю знайти інструкцію, як придбати антибіотики без рецепту [88]. Тому, пошук нових альтернатив є одним з головних методів рішення питання боротьби з патогенними мікроорганізмами.

Багреміцини – це абсолютно нові антибіотики, які можуть стати альтернативою вже існуючих препаратів. Характерною їх рисою є забарвлення, через яке вони отримали свою назву, оскільки весь ряд має забарвлення червоного відтінку. Як було вище зазначено, бактеріємії, які пропонується лікувати, лікуються лише за допомогою антибіотикотерапії. Варто відмітити, що в цьому процесі найефективнішою методикою є саме ін'єкційне введення, оскільки при такому методі відзначається висока швидкість дії препарату та його біологічна доступність, порівняно з пероральним введенням. Також, до загальних переваг ін'єкційних форм відносять можливість введення пацієнту в непритомному стані, а також можливість введення ліків, що розкладаються в шлунково-кишковому тракті. Ще однією та важливою характеристикою ін'єкцій є точність та зручність дозування. Тому, пропонується виготовляти саме ін'єкційну форму багреміцинів для ефективного лікування бактеріємії [5,75,89].

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

3.2.1. Обґрунтування форми випуску багреміцинів

Антибіотики, до яких відносяться й багреміцини - клас ліків, що використовуються у боротьбі з бактеріальними інфекціями. Вони уповільнюють зростання бактерій, допомагаючи організму впоратися з недугою. Препарати дозволяють запобігти важким ускладненням, що розвиваються в результаті інфекційних захворювань [90].

Антибіотики в Україні представлені у різних формах випуску. Найчастіше їх можна купити у вигляді [90]:

- таблеток;
- капсули;
- сиропів (переважно це антибіотики для дітей);
- розчинів для внутрішньом'язових та внутрішньовенних ін'єкцій;
- мазей.

Вибір форми медикаменту залежить від типу інфекції, стану пацієнта та рекомендацій лікаря. Тому, для більш ретельного вибору форми, маємо розглянути схему лікування бактеріємії антибіотикотерапією [90].

Пацієнтам з підозрою на бактеріємію призначають емпіричні **внутрішньовенні антибіотики** після отримання відповідних результатів посівів із потенційних бактеріальних джерел та крові. Раннє лікування бактеріємії з відповідним антибактеріальним режимом підвищує виживання [91].

Продовження терапії включає прийом необхідних антибіотиків згідно з результатами посівів та тестів на чутливість, дренування будь-яких абсцесів та зазвичай видалення будь-яких внутрішніх пристроїв, які є можливим джерелом бактерій [91].

Як тільки досягається контроль над осередком інфекції та спостерігається клінічне поліпшення, **терапія може бути завершена відповідними пероральними антибіотиками** [91].

Багреміцини пропонується використовувати як прямі аналоги поточних антибіотиків, які застосовуються для лікування зазначеного захворювання, а тому вони передбачувано призначені для активної форми бактеріємії, що каже про доцільність використання внутрішньовенних препаратів, тобто ін'єкційних, але, для більш ретельного порівняння, пропонується також розглянути й пероральні види препарату, оскільки вони також можуть застосовуватись для завершення лікування неприємного захворювання.

Для перорального застосування лікарські засоби випускаються у різноманітних формах. Це таблетки, капсули та мікрокапсули, пілюлі, драже, порошки, розчини, суспензії, сиропи, емульсії, настої, відвари, гранули, краплі та інші форми випуску ліків. Для покращення всмоктування основних дієвих речовин лікарських засобів створено технології для покращення цього процесу. До них належать пресування таблеток, покриття таблеток або інших лікарських засобів кислотостійкою плівкою та створення терапевтичних пероральних систем у вигляді таблетки для рівномірного вивільнення активних компонентів лікарського засобу у шлунково-кишковому тракті. Кероване вивільнення лікарських речовин може також досягатися за рахунок створення мікрокапсул із препаратом, покритим спеціальною речовиною (полімером), що повільно розчиняється під впливом соків травної системи та забезпечує рівномірне

надходження препарату в шлунково-кишковий тракт шляхом дифузії лікарської речовини через мембрану капсули [92].

Таблетки є найпоширенішою формою лікарських засобів. Їх виготовляються шляхом подрібнення та пресування діючих речовин у тверду субстанцію з гладким покриттям. Після вживання таблетки потрапляють в шлунок, набухають, після чого розчиняються та всмоктуються в організм. Близько половини лікарських засобів випускають саме у формі таблеток [93].

Переваги таблетованої форми [93]:

- міцність та довговічність;
- чіткість дозування;
- в одній таблетці може міститися більш високе дозування;
- деякі таблетки можна жувати;
- їх можна розділити на кілька частин;
- таблетки значно дешевші у виробництві.

Недоліки [93]:

- з моменту попадання таблетки в рот і рухаючись стравоходом, на неї впливає цілий ряд руйнівних факторів. Тому частина поживних елементів може просто не дійти до шлунка;
- найчастіше таблетки мають неприємний смак або післясмак;
- повільно діють;
- передозування більш вірогідні таблетками.

Для лікування бактеріємії найчастіше за все використовують 3 види антибіотиків – пеніцилін, клоксацилін та еритроміцин [94]. Щодо таблетованої форми, на Українському ринку присутні лише таблетки еритроміцину від двох фірм – БХФЗ (Україна) та АТ «ВІТАМІНИ» (Україна). При цьому, біодоступність цих препаратів максимально становить 65%, що каже про вагомі втрати та зменшення ефективності дії антибіотику [95,96].



Рис.3.1. Препарати проти бактеріємії, що випускаються у таблетованій формі [95,96]

Другою популярною пероральною формою випуску лікарських препаратів є капсули. Це лікарські препарати, які поміщені в оболонку, своєрідний футляр. Капсули бувають желатинові та целюлозні. На відміну від таблеток, капсули спочатку доставляють діючу речовину в шлунок або кишечник, і потім швидко вивільняють його [93].

Переваги [93]:

- як правило, капсули менші за розміром, що полегшує їх ковтання;
- мають гарний вигляд;
- швидко розчиняються та діють;
- не мають неприємного смаку та запаху;
- мають вищу абсорбцію;
- за бажання капсулу можна розкрити і витягти порошкоподібну «начинку».
- вона також не має ні смаку, ні запаху, що також полегшує її прийом.

Недоліки [93]:

- капсули мають менший термін придатності;
- для досягнення найбільшої дози або широкого складу, виробники змушені збільшувати розмір капсули, що не завжди зручно під час приймання;
- містять нижчі дози ліків;
- мають вищу вартість.

Щодо капсул, у такій формі з усіх зазначених антибіотиків проти бактеріємії представлено лише клоксацилін. На нашому ринку можна придбати

лише 2 препарати у капсулах, що містять цей антибіотик – Вампілокс (Vaishali Pharmaceuticals, Індія) та Руклокс LB (Rusan Pharma Ltd, Індія). Біодоступність капсул приблизно така сама, як і в таблеток, що також можна додати до недоліків цієї лікарської форми [97,98].



Рис.3.2. Препарат проти бактеріємії, що випускається у капсульованій формі [98]

Пеніцилін наразі в Україні продається в одній єдиній лікарській формі, у вигляді порошку для розчину для ін'єкцій [99]. Таким чином, розглянувши популярні пероральні лікарські форми, переходимо до ін'єкційних препаратів.



Рис.3.3. Препарат проти бактеріємії, що випускається у вигляді порошку для розчину для ін'єкцій [99]

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 [100].

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 [100].

Розчин для ін'єкцій (*Solutiones pro injectionibus*) - 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, апірогенну, вільними від механічних домішок [100].

Головною перевагою ін'єкційних форм перед пероральними є високий ступінь біодоступності, що дозволяє ефективно використовувати препарат та уникати потенційних передозувань. Для внутрішньовенних препаратів показник біодоступності може досягати й 100%, коли для таблеток та капсул, щоб досягти хоча б 60% треба передбачувати додаткові речовини, що будуть захищати форму від зовнішніх чинників організму до місця їх всмоктування, що буде потребувати додаткових затрат у грошовому та часовому еквіваленті [101]. Через це, пропонується розглянути й інші потенційні ін'єкційні форми (крім порошку для ін'єкцій, який представлено у вигляді пеніциліну), оскільки вони є більш ефективними, а також все ж таки, використовуються при активній формі бактеріємії.

Переваги ін'єкційного введення ліків [102]:

- 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.

Багреміцини, як і пеніцилін можна виготовити у вигляді порошку для приготування ін'єкцій. Але, окрім цього, пропонується розглянути інші лікарські ін'єкційні форми: ін'єкційний розчин в ампулі або у вигляді готового шприц-тюбика, який є готовим до застосування лікарським препаратом, тобто, лікарська форма у вигляді готового розчину для ін'єкцій. Така пропозиція обґрунтовується біохімічними характеристиками багреміцину, як альтернативи існуючим антибіотикам, а також можливістю його розчиненню в спиртах [103].

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 [104]:

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

Недоліки порошків [104]:

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

Внутрішньовенна ін'єкція - спосіб введення лікарських засобів, при якому лікарський препарат потрапляє в організм безпосередньо у кров'яне русло шляхом проколу венозної судини та подальшого вливання лікарського засобу через додаткове обладнання (шприц) в судину [105].

Перевага внутрішньовенного введення рідких ліків - діючі речовини при введенні в організм не змінюються у місці контакту з тканинами, тому внутрішньовенно можна застосовувати лікарські засоби, які руйнуються під дією ферментів травної системи. При внутрішньовенному введенні забезпечується швидке досягнення лікувального ефекту та більш точне дозування препарату.

Тому внутрішньовенна ін'єкція частіше застосовується при наданні невідкладної медичної допомоги, особливо у випадках, коли хворий знаходиться без свідомості та не може ковтати. Окрім цього, при внутрішньовенному введенні можна регулювати швидкість введення препарату, застосовуючи внутрішньовенне крапельне введення препарату. На швидкість всмоктування препарату не впливає прийом їжі та значно менше впливають особливості біохімічних реакцій організму конкретної людини, прийом інших препаратів, та стан ферментативної активності організму [105].

Недоліки внутрішньовенного введення рідких ліків - хворий не може самостійно вводити лікарські препарати сам, для чого він повинен користуватися допомогою медпрацівників. При внутрішньовенному введенні ліків, як і при інших видах парентерального застосування лікарських препаратів, існує ризик інфікування пацієнта або медичного працівника збудниками інфекційних захворювань, які передаються через кров. При внутрішньовенному застосуванні збільшується ймовірність побічної дії ліків у зв'язку із більшою швидкістю надходження в організм та відсутністю на шляху надходження препарату біологічних фільтрів організму — слизової оболонки шлунково-кишкового тракту та гепатоцитів. При внутрішньовенному застосуванні дозволяється вводити лише водні та спиртові розчини лікарських препаратів, оскільки олійні розчини можуть викликати емболію судин (допускається введення лише жирових емульсій для парентерального харчування), а також лікарські препарати із місцево подразнювальною дією (які можуть викликати флебіти або тромбофлебіти) і препарати, що пришвидшують згортання крові. Також, недоліком є погана стійкість препарату після контакту з навколишнім середовищем, що вирішується дозованістю препарату [105].

Для створення готових розчинів, варто звернути увагу на розчинники, оскільки багреміцин має свої особливості у цьому питанні. Як розчинник використовують [103,106]:

- дистильовану воду (Aqua destillata);
- етиловий спирт (Spiritus aethylicus 70%, 90%, 95%);

- гліцерин (Glycerinum);
- рідкі масла (Oleum Vaselini, Oleum Olivarum, Oleum Persicorum та ін.).

На жаль, багреміцини не розчинні у воді, а для внутрішньовенному введенні використовуються різноманітні водні розчини з використанням додаткових речовин, в тому числі і спиртів. Кінцева дозволена концентрація спирту етилового для такого введення становить 33%. Але навіть така концентрація може призвести до небажаних реакцій, одна з яких – токсикоз. Тому дослідники все більше рекомендують застосовувати кінцеву концентрацію спирту в препараті не більше 10% [107,108]. Тому, склад рідкого ін'єкційного препарату буде в собі містити не тільки багреміцини, а й етиловий спирт та воду для ін'єкцій.

Висновок: з врахуванням усіх особливостей питання лікування бактеріємії, а також переваг та недоліків використаних лікарських форм, пропонується зупинити свій вибір на рідких лікарських формах для ін'єкційного введення внутрішньовенно. Резюмуючи все вищевикладене, пероральні форми для лікування цього захворювання в загальному представлені таблетками та капсулами. Ці лікарські форми є дуже зручними, але мають набагато меншу біодоступність діючої речовини, а також потребують додаткових речовин, для захисту від чинників, які також будуть зменшувати показник доступності. Крім того, застосування додаткових речовин потребує додаткового обґрунтування, що впирається на обмеженість інформації про багреміцини, які є зовсім новими антибіотиками, а тому – маловивченими.

Щодо препаратів ін'єкційного характеру, було розглянуто 2 лікарські форми, суху у вигляді порошку, та рідкі для можливого застосування у ампулах або шприц-тюбику (оскільки це вже стосується первинної упаковки, її обґрунтування буде продемонстровано нижче, див.п.3.2.2.). Порошкова форма є зручною у зберіганні, але такою ж нестабільною при контакті з навколишнім середовищем. Також, дана форма буде потребувати додаткову закупівлю шприцю та розчину для ін'єкцій, а з врахуванням того, що багреміцини розчинні в спиртах, а розчини для венозних ін'єкцій не можуть складатись на 100% зі спирту через

негативні прояви, потрібно окремо закуповувати і воду для ін'єкцій і сам спирт. Готові розчини вирішують останнє питання, що робить цю форму більш привабливою за порошок. Тому, спираючись на всі за та проти, обираємо готовий розчин з антибіотиком для внутрішньовенного введення за допомогою ін'єкції.

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки багреміцинів

В минулому пункті (п.3.2.1.) нами було обрано виготовлення рідкої лікарської форми для внутрішньовенних ін'єкцій на основі водно-спиртового розчину. При цьому було запропоновано в подальшому розглянути ампули та шприц-тюбики як можливу первинну упаковку. Така пропозиція обумовлена тим, що тривалість лікування бактеріємії складає близько 2 тижнів та потребує внутрішньовенного введення 2 рази на день. Було розраховано необхідну кількість багреміцинів за курс для кожної вікової категорії, з цього можна визначити кількість однієї дози. Основною групою хворих на бактеріємію виступають люди старше 12 років і вище, їх частка становить 98,3%, тому пропонується орієнтуватись саме на цю цільову аудиторію для середнього прорахунку. На весь курс для цієї групи на одну людину припадає 5,1 г багреміцинів. Тоді, в одній дозі має бути:

$$(5,1/14)/2 \approx 0,18\text{г/дозу}=180 \text{ мг/дозу}$$

Тепер, знаючи дозу, можемо визначити приблизний об'єм рідкого препарату. Тут маємо врахувати, що кінцева концентрація спирту в препараті становить всього 10%, а тому якщо готувати рідкі препарати в об'ємі 1 мл, на дозу багреміцину в 0,18 г припадатиме 0,1 мл 100-% етилового спирту (або 0,096 мл 96-% спирту). Цього недостатньо для повного розчинення запропонованого антибіотику, тому логічно збільшити одне дозування до 5 мл, де 0,18 г багреміцинів буде розчинятися в 0,5 мл 100-% етилового спирту (або 0,48 мл 96-% спирту). В такій кількості етанолу антибіотики вже зможуть розчинитися [103], тому об'єм лікарського засобу буде становити 5 мл.

З врахуванням об'єму однієї дози, пропозиція розгляду ампул та шприц-тюбиків залишається незмінною. Тому, для початку пропонується розглянути саме ампули, через їх поширеність на теренах нашої країни.

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 шприцю, як додаткового знаряддя [109].

Проте, ампули мають один великий недолік, а саме забруднення розчинів скляними мікрочастинками при розбитті скляних ампул, наявність металів, черезшкірні пошкодження. Скляні мікрочастинки, що утворюються під час швидкого відкриття ампул, а також метали, які забруднюють їхній вміст, можуть бути аспіровані та введені кількома шляхами. Екзогенне забруднення склом і металами може досягати кількох місць в організмі. Вони викликають органічні реакції, які можуть призвести до травм. Розкриття ампул може наражати фахівців на ризик черезшкірних травм. Ці ураження підвищують біологічний ризик, оскільки є воротами для вірусів і бактерій. Системи відкриття ампул (VIBRAC і OPC) були розроблені для зменшення частоти таких нещасних випадків [109].

Альтернативні склі матеріали можуть бути цікавою стратегією підвищення безпеки. Використання попередньо наповнених шприців може являти собою еволюцію щодо безпеки [109].



Рис.3.4. Система відкриття ампул VIBRAC (справа) та OPC (зліва) [109].

Як альтернатива скляним ампулам може стати технологія BFS (blow-fill-seal). Сучасна технологія BFS (blow-fill-seal) гарантує асептичну упаковку різноманітних продуктів у ємності різного обсягу. Порівняно з традиційним процесом «наповнення-закупорювання» технологія «видування-наповнення-запаювання» є повністю автоматичним процесом, що практично не вимагає втручання оператора, що дає низку незаперечних переваг [110]:

- Менші розміри виробничих площ
- Скорочення потреб у персоналі
- Зменшення вимог до чистоти приміщення
- Захист продукту від забруднення
- Уникнення проблем матеріально-технічного забезпечення під час постачання та зберігання порожніх контейнерів
- Будь-яка форма флакона, включаючи ампули з нанесенням логотипу компанії
- Великий вибір матеріалів для виробництва ампул
- У довгостроковій перспективі економічніша технологія

Процес починається з екструзії пластикових гранул у вигляді гарячої порожнистої трубки рідкого пластику, внаслідок чого з'являється заготівка [110].

Наступний крок – видувне формування ампул із пластикових гранул. Заготовка затискається прес-формами, і флакон формується через видування стерильним стисненим повітрям або вакуумом, або використанням і вакууму, і видування. Ампула приймає вигин каналу прес-форми. Виготовлена таким чином ампула відкривається зверху і залишається незакритою, доки не будуть зроблені наступні кроки – наповнення та запаювання. При цьому пластик все ще гарячий і знаходиться у розплавленому стані [110].

Далі – заповнення відкритої сформованої ампули зверху. Часто процес заповнення може виконуватися під потоком очищеного стерильного повітря для того, щоб уникнути забруднення під час наповнення ампул. Установка повітря може мати різний тиск, який може бути змінений автоматично для того, щоб підтримувати постійний тиск повітря в різних ситуаціях [110].

Наступний крок – це запаювання верхньої частини ампули, яка все ще відкрита і знаходиться у гарячому розплавленому стані. Верхня частина затискається прес-формами і, як наслідок, верх ампули формується, запаюється і водночас охолоджується. Результат-герметично запаена ампула [110].

Останнім етапом є обдування для видалення відходів, вирівнювання ампула та постачання за межі машини. Повністю процес екструзії, видування, наповнення, запаювання та видалення відходів займає від 10 до 18 секунд залежно від типу та розміру ампул [98].

Для виготовлення ампул наразі застосовують поліетилен Purell. Марка поліетилену Purell має високу жорсткість та відмінний опір хімічному впливу та рекомендований до використання у фармацевтиці для виготовлення упаковки,

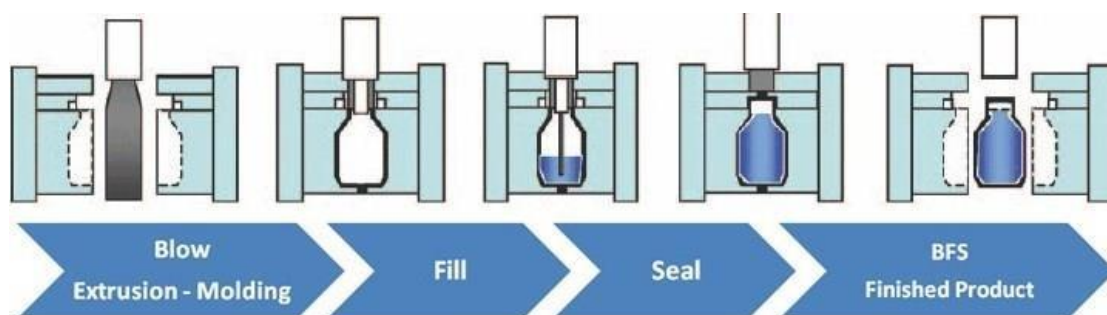


Рис.3.5. Схематичне зображення технології BFS [111]

ковпачків та герметизуючих ущільнювачів. Матеріал повністю відповідає вимогам Європейської Фармакопеї (EP) і Американської Фармакопеї (USP). В Україні Nikorharm першою розпочала виробництво інфузійних та ін'єкційних розчинів з використанням технології BFS, що може казати про сучасність даної технології [112].

Шприц-тюбик — це шприц ін'єкційний одноразового застосування, наповнений лікарським препаратом. Складається з еластичного полімерного корпусу (ампули), у горловину якого запресована попередньо простерилізована сталеві ін'єкційна голка, герметично закрита полімерним ковпачком. Шприци одноразового застосування виготовляють з певних сортів поліпропілену, полістиролу і співполімеру стиролу та акрилонітрилу, дозволених до застосування

для медичних цілей органами охорони здоров'я. Для поршня використовують високоякісний натуральний каучук або силіконовий каучук з покриттям поверхні поршня полідиметилсилоксаном [113].



Рис.3.6. Приклад препарату, що випускається у вигляді шприц-тюбику [114]

Щоб застосувати шприц, утримуючи рукою його корпус, насувають ковпачок. При цьому мандрен проколює мембрану. Знімають ковпачок разом із мандреном. Піднімають шприц-тюбик голкою вгору і натисканням на стінки корпусу наповнюють розчином його верхню частину, видаляючи повітря з голки. Голку вводять у підшкірну клітковину і натисканням на корпус шприца вводять ліки [115].

Зручність шприц-тюбиків полягає в тому, що споживачу непотрібно додатково закуповувати розчин для ін'єкції та шприць, він має готовий препарат для одноразового застосування. Але мінусом цієї лікарської форми є її неекологічність, тому що потребує застосування жорстких пластмас для зберігання та транспортування [113,115].

З врахуванням усіх за та проти, пропонується обрати ампули, які будуть виготовлятися за технологією BFS. Окрім поліетилену Purell, для видуву ампул можна використовувати поліетилен терефталат (ПЕТ), смоли CZ, Zeonex і Toras. Ці матеріали вважаються найбільш вживаними для різноманітних лікарських засобів та часто застосовуються для розчинів з антибіотиками, оскільки є з ними сумісними [116]. Щодо найбільш спорідненої речовини до багреміцинів, феровердини щонайменше сумісний з поліетиленом [117]. Оскільки немає додаткових досліджень щодо впливу різноманітних полімерів на багреміцини, пропонується розглянути саме ці найбільш вживані полімери. Для вирішення

вибору матеріалу ампули пропонується провести порівняння. Характеристика полімерів показано в табл.3.1.

Таблиця 3.1

Порівняння полімерів для виготовлення ампул за технологією BFS

Тип полімеру	Вартість	Здатність до переробки	Джерело
Поліетилен Purell	75 грн/кг	Переробка або спалювання	[118,119]
ПЕТ	40 грн/кг	Лише переробка	[120,121]
Смола CZ	36,9 грн/кг	Лише переробка	[121,122]
Смола Zeonex	47,1 грн/кг	Лише переробка	[123,124]
Смола Toray	15,1 грн/кг	Лише переробка	[124,125]

Отже, найдешевшим варіантом є смола Toray. Основою цього матеріалу є циклоолефіновий полімер. Циклічні олефінові полімерні (COP) смоли (реєстраційний номер CAS 26007-43-2, включаючи полімери та співполімери, які іноді називають циклоолефіновими полімерами або співполімерами) привертають увагу через їх структурну міцність, оптичну прозорість, і біосумісність. Тому, спираючись на ці характеристики, а також на вартість матеріалу, пропонується обрати саме смолу Toray [125].

Попередньо було розраховано, що тривалість лікування триватиме 2 тижні по 2 дози на день. Тобто загальна кількість ампул, яка необхідна 1 людині становить 28 шт. Пропонується виготовляти по 10 ампул, з'єднаних одна між одною, на одну пачку, для зручності потенційних споживачів, оскільки якщо передбачити коробку з 20 ампулами, наступного разу прийдеться докупувати ще одну пачку і в залишку буде 12 непотрібних ампул, а якщо по 10 шт., то ця кількість становитиме лише 2 ампули. Як було вираховано раніше, одна ампула має містити 5 мл ін'єкційного розчину, тому передбачаємо 10 ампул об'ємом 5 мл.



Рис.3.7. Приклад ампул, які одержують по технології BFS [113]

Препарат не розкладається від сонячних променів, а тому не потребує використання темних пластмас. Також, він є стабільним при кімнатній температурі, тому не потребує додаткового зберігання в холодильнику [103]. Як і всі лікарські препарати, його варто зберігати подалі від дітей і бажано в темному місці, через потенційну можливість деградації пластмаси.

Щодо вторинної упаковки, для «класичних ампул» використовують пластиковий блістер для кращого зберігання та транспортування. Проте, обрані ампули не скляні, а полімерні і не можуть бути такими ж крихкими. Крім того, технологія BFS дозволяє об'єднувати між собою відповідну кількість ампул, як це було вказано раніше, тому використання спеціального блістеру в даному випадку непотрібне.

Для обраних ампул варто передбачити картонну коробку, як основну вторинну упаковку, за її простоту та екологічність.

Отже, пропонується виготовляти ін'єкційний препарат, у ампулах об'ємом 5 мл, що виконані з COP за допомогою технології BFS, об'єднані по 10 штук на пачку з картонної коробки.

Висновки: в попередньому пункті було обґрунтовано використання рідкого ін'єкційного препарату як основної лікарської форми. З врахуванням потреби було визначено, що одна доза препарату має становити 5 мл, для того, щоб багреміцини могли розчинитись в спирті. З врахуванням цього об'єму було розглянуто потенційні первинні упаковки, які представлені ампулами та шприц-тюбиком.

Класичні ампули мають суттєвий недолік, а саме частинки мікроскла, які можуть потрапити у кровотік та призводити до негативних явищ організму, через що, як альтернатива, була розглянута технологія BFS, яку технічно можна назвати більш безпечним, а іноді навіть екологічним аналогом. Проте, через відсутність інформації щодо сумісності різних полімерів щодо багреміцину, були розглянуті лише найбільш вживані речовини для отримання пластикових ампул. Недоліком такої первинної упаковки є те, що потрібно окремо купувати шприц, проте через доступність аптек у кожному місці, наразі це не така велика проблема.

Шприц-тюбик – дуже зручна форма, оскільки це вже готовий лікарський препарат, але його незручно брати із собою, оскільки він займає в будь-якому випадку більше місця, ніж той самий флакон чи ампула. Також, він потребує більшої кількості пластику, ніж необхідно для виробництва ампул, що не дуже екологічно. Також, якщо відбуваються якісь непередбачувані ситуації, в найкращому випадку, можна залишитись без препарату (у випадку пошкодження корпусу шприцю), а в гіршому – поранити себе або іншу людину. Крім того, виробництво шприц-тюбику банально дорожче за пластикові ампули, що буде здорожчувати кінцевий продукт.

Тому, спираючись на зручність форми, її безпечність та ефективність самого лікарського препарату, було обрано виробництво пластикових ампул з рідким препаратом на основі водно-спиртового розчину, який потрібно вводити ін'єкційно внутрішньовенно.

3.3. Вибір біологічного агента для синтезу багреміцинів

Багреміцини – це новітні антибіотики, що синтезуються актиноміцетами роду *Streptomyces* та виявляють активність проти грампозитивних бактерій і грибків, а також слабку протипухлинну активність проти клітинної лінії аденокарциноми людини [4].

У доступних літературних джерелах дослідження біосинтезу багреміцинів є поодинокими [5]. Натомість представлено відомості про одержання мікробним шляхом споріднених багреміцинам сполук, таких як пара-кумарова кислота [41].

Стаття [5] є однією з найперших та найінформативніших робіт про дослідження отримання багреміцинів мікробним синтезом. Штам *Streptomyces* sp. Тії 4128 культивували у середовищі з глюкозою, гліцерином та крохмалем як субстратами. Продукування багреміцинів починалось на 21 годину вирощування та досягало максимальних значень 8 мг/л багреміцину А та 4 мг/л багреміцину В після 355 годин.

Також штам *Streptomyces* sp. Тії 4128 продукував пара-кумарову кислоту у кількості 17 мг/л від 225 до 334 годин вирощування. Таким чином було визначено, що попередником багреміцину А є саме пара-кумарова кислота [5].

Отриманню пара-кумарової кислоти також присвячена робота [41]. Пара-кумарову кислоту одержували у середовищі з D-глюкозою за допомогою сконструйованого штаму *S. cerevisiae* S288C. Двофазна ферментація дозволила збільшити швидкість продукції пара-кумарової кислоти при забезпеченні двох значень рН – 13,65 і 9,45 мг/л/год при рН 6 і 4,5 відповідно. Згідно даних статті, за вирощування штаму у середовищі YEPD кількість цільової кислоти у ферментаційному середовищі становила близько 450 мг/л.

З огляду на рис. 3.8, в основі структури багреміцинів А та В лежить структура пара-кумарової кислоти. Було визначено, що при порушенні гену *bagA*, який кодує тирозиноаміачну ліазу, відбувається припинення вироблення кумарової кислоти та багреміцинів. При цьому кумарова кислота відновила процес утворення багреміцинів. Тому це засвідчує, що кумарова кислота є попередником для біосинтезу багреміцинів, а ген *bagA* кодує тирозиноаміачну ліазу для синтезу кумарової кислоти [126].

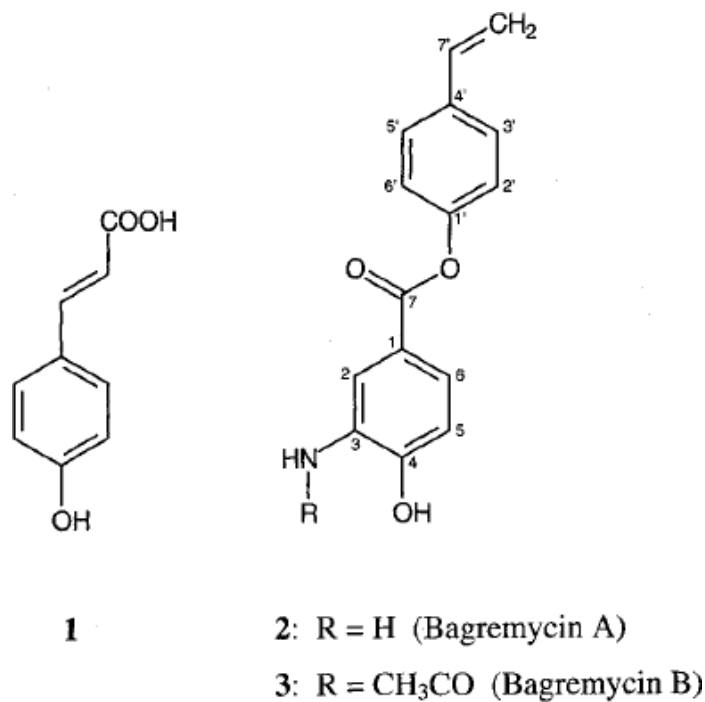


Рис.3.8. Структура пара-кумарової кислоти (1), багреміцину А (2) та В (3)

Тому як цільовий продукт можна розглядати як багреміцини А та В, так і пара-кумарову кислоту, яка є попередником синтезу багреміцинів.

У таблиці 3.8. представлено узагальнені дані параметрів синтезу багреміцинів та пара-кумарової кислоти.

Дані таблиці 3.2. свідчать про те, що найвищу кількість пара-кумарової кислоти одержали при культивуванні сконструйованого штаму *S. cerevisiae* S288C. Однак штам *Streptomyces* sp. Тіі 4128 синтезує відразу два нових антибіотики, а також пара-кумарову кислоту в останні 109 годин культивування. При вирощуванні обох біологічних агентів використовувались середовища, що містять глюкозу, пептон та дріжджовий екстракт. Тому далі розрахуємо ціну 1 л кожного з поживних середовищ (табл. 3.2).

Умови культивування продуцентів багреміцинів та пара-кумарової кислоти

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, мг/л	Умови культивування	Література
<i>Streptomyces</i> sp. Tii 4128	Глюкоза – 10 Гліцерин – 10 Крохмаль -10 Кукурудзяне борошно – 2,5 Пептон – 5 Дріжджовий екстракт – 2 NaCl – 1 CaCO ₃ – 3	Багреміцин А – 8 Багреміцин В – 4	Культивування проводили протягом 355 годин, температура 27°C, перемішування середовища 1000 об/хв., в режимі аерації 0,5 об/об/м	[5]
<i>Streptomyces</i> sp. Tii 4128	Глюкоза – 10 Гліцерин – 10 Крохмаль -10 Кукурудзяне борошно – 2,5 Пептон – 5 Дріжджовий екстракт – 2 NaCl – 1 CaCO ₃ – 3	Пара-кумарова кислота – 17	Культивування проводили протягом 355 годин, температура 27°C, перемішування середовища 1000 об/хв., в режимі аерації 0,5 об/об/хв	[5]
<i>S. cerevisiae</i> S288C	D-глюкоза – 20 Пептон – 20 Дріжджовий екстракт -10	Пара-кумарова кислота – 450	Культивування проводили протягом 72 годин, температура 30 °C, рН 6, аерація в режимі 30% насичення киснем	[41]

**Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів
багреміцинів та пара-кумарової кислоти**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело* (1,2,3,4,5)
<i>Streptomyces</i> sp. Тії 4128	Глюкоза – 10	22,7	0,2	1
	Гліцерин – 10	40,95	0,4	2
	Крохмаль -10	23	0,2	3
	Кукурудзяне борошно – 2,5	24,1	0,06	4
	Пептон – 5	1060	5,3	5
	Дріжджовий екстракт – 2	1100	2,2	6
	NaCl – 1	19	0,01	7
	CaCO ₃ – 3	6	0,01	8
Вартість 1 л середовища становить – 8,38 грн.				
<i>Streptomyces</i> sp. Тії 4128	Глюкоза – 10	22,7	0,2	1
	Гліцерин – 10	40,95	0,4	2
	Крохмаль -10	23	0,2	3
	Кукурудзяне борошно – 2,5	24,1	0,06	4
	Пептон – 5	1060	5,3	5
	Дріжджовий екстракт – 2	1100	2,2	6
	NaCl – 1	19	0,01	7
	CaCO ₃ – 3	6	0,01	8
Вартість 1 л середовища становить – 8,38 грн				
<i>S. cerevisiae</i> S288C	D-глюкоза – 20	22,7	0,4	1
	Пептон – 20	1060	21,2	5
	Дріжджовий екстракт -10	1100	1,1	6
Вартість 1 л середовища становить – 22,7 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на грудень 2023 р.:

1 – <https://prom.ua/p1026096823-glyukoza-pischevaya.html>

2 – <https://prom.ua/p1026099491-glitserin.html>

3 – <https://flagma.ua/krahmal-kartofelny-o12201921.html>

4 – https://100pudov.in.ua/ru/shop/muka-kukuruznaya_-1-kg-p321

5 – <https://prom.ua/p1514436596-ammonij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=M14wOA>

6 – <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>

7 – <https://prom.ua/p1640793618-sol-pischevaya-kamennaya.html?&primelead=MC45MDk5OTk5Nw>

8 – <https://flagma.ua/caco3-karbonat-kalciya-99-99-o8778043.html>

Отже, для отримання багреміцинів А та В та пара-кумарової кислоти при культивуванні штаму *Streptomyces* sp. Тіі 4128 використовувалось одне і те ж поживне середовище, вартість якого майже утричі менша, ніж для біосинтезу пара-кумарової кислоти дріжджів *S. cerevisiae* S288С.

Тому для вибору оптимального біологічного агента далі розрахуємо умовну вартість 1 мг продукту та кількість продукту, синтезованого за 1 год. Згідно табл. 4.3, штам *S. cerevisiae* S288С синтезує більше пара-кумарової кислоти, порівняно з *Streptomyces* sp. Тіі 4128. Однак *Streptomyces* sp. Тіі 4128 утворює одразу два типи антибіотиків багреміцинів, окрім пара-кумарової кислоти.

Разом з тим, оскільки штам *Streptomyces* sp. Тіі 4128 виділяє в культуральну рідину комплекс багреміцинів А та В, виділення буде проходити без розділення даних антибіотиків, а їх антимікробна дія буде підвищеною внаслідок синергізму. Внаслідок того, що пара-кумарова кислота утворюється лише в останні 109 годин культивування продуцента, регулювання її біосинтезу можна буде досягти скороченням процесу культивування.

Таблиця 3.4

Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні продуцентів

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація продукту, мг/л	Умовна вартість 1 мг продукту, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, синтезованого за год, мг/л
<i>Streptomyces</i> sp. Тіі 4128	8,38	Багреміцин А – 8	1,04	355	0,02
		Багреміцин В – 4	2,09		0,01
<i>Streptomyces</i> sp. Тіі 4128	8,38	Пара-кумарова кислота – 17	0,49	355	0,04
<i>S. cerevisiae</i> S288С	22,7	Пара-кумарова кислота – 450	0,05	72	6,25

Отже, слід зробити висновок, що в якості оптимального біологічного агента для біосинтезу багреміцинів обираємо актиноміцетний штам *Streptomyces* sp. Тіі 4128, який синтезує комплекс багреміцинів на дешевому поживному середовищі.

3.4. Розрахунок потреби у багреміцинах для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції

Очистка та виділення багреміцинів А та В виконується шляхом колонкової хроматографії. Для промислового виробництва антибіотиків такий метод є дуже дороговартісним. Хроматографія в першу чергу направлена на розділення фракцій цих антибіотиків. Через це, пропонується розробити комплексний антибіотичний препарат, який міститиме як багреміцин А та багреміцин В, оскільки є методи очищення цих антибіотиків без використання хроматографічного аналізу [5].

Багреміцин А та В мають доволі широке коло антимікробної активності. Вони ефективні проти низки грамнегативних (наприклад, *E. coli*), грампозитивних бактерій (наприклад, MRSA та *B. subtilis*), а також деяких дріжджів, як це було вказано вище. З усього списку зазначених бактерій пропонується розробити препарат проти грампозитивних бактерій, що спричиняють бактеріємію, а саме *B. subtilis* та MRSA [8,74,75].

Розробку препарату будемо вести за статистикою бактеріємії, оскільки якщо не лікувати дане захворювання, воно може спровокувати інші, більш тяжчі патологічні стани, наприклад септицемія або інфекційний ендокардит та ін.[76,127].

По всьому світу фіксується від 60 до 75 випадків бактеріємії на 100000 населення. Кількість випадків, що припадає на грампозитивну бактеріємію за останніми статистичними даними становить 43% [128,129].

Кількість населення України станом на 2023 рік становить 36,7 млн. осіб [130]. Оскільки зараз країна знаходиться в стані війни, ризик поранення залишається дуже високим, як для військового на полі бою, так і для цивільного під час обстрілу чи ракетної/дронові небезпеки. Через рани легко отримати збудник бактеріємії. Тому, для розрахунку випадків захворювання пропонується брати максимальне число випадків – 75 на 100 000 населення. Тоді, кількість випадків бактеріємії в нашій країні приблизно становитиме:

$$\frac{36700000 \times 75}{100000} = 27525 \text{ випадків}$$

З них, кількість випадків, що припадає на грампозитивну бактеріємію становить:

$$27525 \times 0,43 \approx 11836 \text{ випадків}$$

Для прорахунку відповідної кількості препарату беремо за основу ін'єкційний препарат бацитрацину. В одній ін'єкції міститься 50000 одиниць активності бацитрацину. Це відповідає 1 г антибіотику, оскільки на 1 мг припадає 50 одиниць активності [131,132].

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) бацитрацину щодо грампозитивних бактерій (MRSA та *B. subtilis*) становить 128 мкг/мл, а для багреміцинів А та В – 100 мкг/мл. Тоді, можна скласти пропорцію:

$$128 \text{ мкг/мл} - 1 \text{ г}$$

$$100 \text{ мкг/мл} - x$$

$$\frac{100 \times 1}{128} = 0,78 \text{ г багреміцинів/ампула}$$

Отже, на 1 ампулу припадає 0,78 г багреміцинів.

Дозування проти бактеріємії в загальному діляться наступним чином: діти від 1 до 6 років – 12 мг/кг, дітям від 7 до 11 років – 9 мг/кг, і дітям віком від 12 років та дорослим – 6 мг/кг. Враховуючи, що для лікування потрібно менше багреміцину (1 г препарату еквівалентно 0,78 г багреміцинів), в перерахунку дозування становить: група 1-6 років - **9,36 мг/кг**; 7-11 років – **7 мг/кг**; 12 і старше – **4,68 мг/кг** (виділені дані використовуються для подальшого розрахунку) [133-136].

Тривалість лікування стійкої бактеріємії зазвичай становить 4–6 тижнів. А звичайної неускладненої – максимум 2 тижні. Прийом ліків відбувається внутрішньовенно, 2 рази на день [133-136].

Отже, для подальших розрахунків маємо знати приблизну середню вагу кожної категорії. Середня вага дівчаток віком 1 рік становить 9,0-10,2 кг (середнє 9,6 кг), а хлопчиків 9,4-10,9 кг (10,15 кг). У 6 років цей показник для дівчат

становить 18,7-22,5 кг (20,6 кг), а для хлопців – 18,8-22,8 кг (20,8 кг). У 7 років для дівчат нормальна середня вага становить 20,6-25,3 кг (22,95 кг), для хлопців – 21,0-25,4 кг (23,2 кг). В 11 років ці показники становлять 30,7-38,9 кг (34,8 кг) та 31,0-39,9 кг (35,45 кг) відповідно. Середня вага чоловіка в Україні становить 80 кг, а жінки – 71 кг [137,138].

Отже, середня вага вікової групи від 1 до 6 років становить:

$$\left(\frac{9,6 + 10,15}{2} + \frac{20,6 + 20,8}{2}\right)/2 \approx 15,3\text{кг}$$

Середня вага вікової групи від 7 до 11 років становить:

$$\left(\frac{22,95 + 23,2}{2} + \frac{34,8 + 35,45}{2}\right)/2 = 29,1\text{кг}$$

Середня вага дорослої групи становить:

$$\frac{71 + 80}{2} = 75,5\text{кг}$$

Маючи ці дані, можемо розрахувати потребу в препараті на основі багреміцинів. Для розрахунків беремо до уваги, що лікування триватиме 2 тижні по 2 прийоми препарату на добу.

Кількість препарату, яка потрібна для 1 людини вікової групи 1-6 років:

$$(9,36 \times 2) \times 15,3 \times 14 = 40009,8\text{мг} = 4\text{г}$$

Кількість препарату, яка потрібна для 1 людини вікової групи 7-11 років:

$$(7 \times 2) \times 29,1 \times 14 = 5703,6\text{мг} = 5,7\text{г}$$

Кількість препарату, яка потрібна для 1 дорослій людині:

$$(4,86 \times 2) \times 75,5 \times 14 = 5137,02\text{мг} = 5,1\text{г}$$

Кількість дітей від 1 до 6 років становить близько 4 млн. Тобто, від загальної кількості це 10,9%, кількість дітей віком від 7 до 11 років – 4,6 млн, тобто 12,5%. Кількість дітей до 1 року становить близько 2%. Все інше – це доросле населення, яке складає 74,6% [139]. Якщо перерахувати чисельність без врахування дітей до 1 року (оскільки без них все вищевказане населення становить 98%, що незручно для подальших розрахунків), матимемо наступну відсотковість: діти від 1 до 6 років – **11,12%**, діти від 7 до 11 років – **12,76%**, 12

років і вище – **76,12%** (виділені дані для подальшого розрахунку). Перевірка: $11,12+12,76+76,12=100\%$.

За статистикою, бактеріємія більше притаманна людям літнього віку. Для дітей від 1 до 11 років, припадає близько 1,7% випадків, а інші 98,3% - для людей старше 11 років [140]. Використовуючи вищенаведені дані щодо відсоткової кількості населення, можемо визначити кількість випадків. Важливим є співвідношення дітей віком від 1 до 6 років до дітей віком від 7 до 11 років, оскільки вони мають за статистикою однакову захворюваність. Якщо об'єднати відсоток цієї групи в один загальний, він буде становити $11,12+12,76=23,88\%$. Отже, 23,88% кількості вікової групи відповідає 1,7% випадкам захворювання. Знаючи це, можна дізнатися скільки випадків захворювання припадає на 2 групи дітей. Отже:

$$23,88\% \text{ населення} - 1,7\% \text{ випадків захворювання} = 11,12\%$$

населення (діти від 1 до 6 років) – x

$$\frac{11,12 \times 1,7}{23,88} = 0,79\% \text{ випадків захворювання}$$

Кількість випадків, що припадає на групу 7-11 років:

$$1,7 - 0,79 = 0,91\%$$

Отже, можемо розрахувати приблизну кількість випадків в країні по віковій групі, враховуючи, що в загальному кількість захворюваності становить 11 836. Перевірочний розрахунок показано в табл.3.5.

Знаючи кількість випадків, можна поррахувати потребу населення України в антибіотичному препараті на основі багреміцинів. Такий прорахунок показано в табл.3.6.

Таблиця 3.5.

Кількість випадків бактеріємії в Україні за віковою групою

Вікова категорія	Захворюваність за віковою належністю, %	Кількість випадків бактеріємії	Кількість випадків по віковим категоріям
Від 1 до 6 років	0,79	11 836	94
Від 7 до 11 років	0,91		108
Від 12 років і старше	98,3		11634

**Перерахунок необхідної кількості багреміцинів для розробки
препарату проти бактеріємії**

Вікова категорія	Кількість випадків	Необхідна кількість препарату на весь курс для 1 людини, г	Кількість препарату, яка потрібна для забезпечення усіх потреб, г
Від 1 до 6 років	94	4	376
Від 7 до 11 років	108	5,7	615,6
Від 12 років і старше	11634	5,1	59 333,4
Всього			≈ 60,4 кг

Отже, необхідна кількість антибактеріального препарату на основі багреміцинів для хвороих становить 60,3 кг. Оскільки на вітчизняному ринку є багато препаратів такого спрямування, а також оскільки багреміцини – це нові антибіотики для лікування бактеріємії. Оскільки в Україні існують й інші препарати для лікування цього захворювання, пропонується забезпечувати лише 2%. Тоді, кількість препарату, яку ми будемо забезпечувати становить:

$$60,4 \times 0,02 \approx 1,21 \text{ кг}$$

Враховуючи те, що під час культивування отримується близько 12 мг/л багреміцинів [5], кількість культуральної рідини становитиме:

$$\frac{1210}{12} \approx 101 \text{ м}^3$$

З врахуванням того, що при виділенні та очистці будуть втрати цільового продукту, які становлять близько 30%, кількість культуральної рідини на рік становитиме:

$$\frac{101}{1 - 0,3} = 144,3 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 144,3 м³ культуральної рідини необхідно 300 робочих трудоднів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 144,3 / 300 \approx 0,481 \text{ м}^3$$

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

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 \cdot 481 \cdot 362 / 24 \approx 7,98 \text{ м}^3,$$

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 – 355 год [5], та вивантаження – 0,5 год, і становить 7 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Отже, за одержаними даними, потреба у багреміцинах в Україні впливає з поточних проблем суспільства, основною з яких є самолікування, яке призводить до поширеності антибіотикорезистентності. Найчастіша причина утворення бактеріємії є грампозитивні бактерії, такі як MRSA та *B. subtilis*, що складає 43% від загальних випадків цього захворювання. Нерідко причиною бактеріємії є різні поранення, через які дана хвороба і потрапляє до організму людини. Враховуючи те, що ризик поранення в Україні наразі дуже високим, через повномасштабне вторгнення Росії, поширення бактеріємії є реальною загрозою та проблемою. Тому, можна зробити висновок про необхідність одержання багреміцинів, як нових лікарських засобів, до яких ще немає стійкості.

Було визначено, що по всій Україні буде забезпечуватись лише 2% громадян, які можуть мати бактеріємію. Таким чином, визначено кількість багреміцинів, яку потрібно забезпечити на рік становить 1,24 кг. Враховуючи те, що при виділенні та очищенні відбуваються втрати близько 30%, кількість культуральної рідини на рік становила 144,3 м³. Виробництво працюватиме весь рік, а тому кількість трудоднів становить 300. Враховуючи це, за один виробничий цикл, який триває 362 години, одержується 8,16 м³ культуральної рідини за цикл.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАГРЕМІЦИНІВ

За наявною літературою, що багреміцини, що феровердини (антибіотики, які утворюються за тим самим шляхом, що й багреміцини, але за наявності заліза), виділяються та очищаються шляхом екстракції з подальшою високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ). Якщо екстракцію ще реально реалізувати в промислових умовах, то застосування ВЕРХ банально недоцільно та неможливо [5,141]. Оскільки іншої інформації немає, пропонується орієнтуватись на схеми виділення попередника багреміцину – паракумарову кислоту [142].

За інформацією із основної статті виділення багреміцинів виконують як з супернатанту, так і з біомаси [5]. Зазвичай антибіотики це екзометаболіти. Але доволі часто зустрічаються випадки, коли антибіотичні речовини синтезуються і в біомасі у низькій кількості, адже ці речовини можуть пригнічувати самого біологічного агента, що їх синтезував [143]. Оскільки багреміцини синтезуються у кількості всього 12 мг/л, втрачати додаткове джерело їх виділення не варто. Тому, роботу над виділенням буде вестись і з супернатантом і з біомасою. Екстрагування багреміцинів з надосаду та осаду відбувається за допомогою різних речовин, а тому першою стадією треба передбачити відокремлення біомаси від супернатанту [144].

Наступним етапом є екстракція антибіотику з супернатанту, та виділення з біомаси. Дана стадія необхідна для відокремлення більшості зайвих речовин від багреміцинів. Різні екстрагенти використовуються через те, що біомаса потребує більш жорстких умов, оскільки її треба зруйнувати та виділити необхідні речовини [5,145]. Отже, наступною стадією є екстракція супернатанту та біомаси. Для супернатанту використовують етилацетат, а для біомаси – метанол.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ</i>			81
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Вергун Ю.В.</i>				РОЗДІЛ 4			<i>Лім.</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Буценко Л.М.</i>				ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ			<i>Арк.</i>
<i>Реценз.</i>					ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ			<i>Аркушів</i>
<i>Н. Контр.</i>					БАГРЕМІЦИНІВ			74
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>			138

Після цього, одержані екстракти об'єднують та упарюють до сухого залишку [5,146]. Оскільки екстракти потребують різних розчинників, об'єднувати їх не доцільно, а тому упарювання кожного буде здійснюватися окремо. Цей етап важливий тим, що відбувається зменшення об'єму подальших розчинників, які використовують для подальшого виділення. Тоді, наступною стадією є висушування недоочищених екстрактів.

Висушені екстракти розчиняють у дихлорметані [5,146]. Це пов'язано з поширеністю дихлорметану як універсального розчинника для речовин, що виділяють методом хроматографії [147]. Одержаний сухий порошок не є кінцевим продуктом, оскільки в ньому містяться й інші сполуки, що було виділено при екстракції. Багреміцини не розчинні у воді, а тому використання інших, відомих розчинників є доволі очевидним кроком [5,146]. Тому, наступним етапом є розчинення екстрактів багреміцинів.

Після розчинення за загальною технологією відбувається хроматографія [5,146]. Але, як це було вище зазначено, застосування ВЕРХ для промислового виробництва є неможливим. За наявною технологією виділенні пара кумарової кислоти використовується аніоніт [142]. Аніоніти – це високомолекулярні полімерні сполуки макропористої і тривимірної гелевої структури (виділення багреміцинів як раз відбувається на гелефому носії [5,146]), які містять речовини лужного типу, які беруть участь в реакціях аніонного обміну. Аніоніти використовують в різних сферах, так як ця речовина не вимивається водою, не стирається, і не піддається іншим хімічним і фізичним трансформаціям. Аніоніт при цьому можна використовувати у промислових масштабах, головне мати колонку відповідного розміру [148]. Тому, наступним етапом варто виділити саме нанесення розчину багреміцинів на аніоніт.

Після цього, відповідні речовини, у нашому випадку багреміцини, знімають відповідним розчинником. Багреміцини розчинні у метанолі, проте, для їх відокремлення, використовують розведені розчини метанолу. Оскільки 100%

метиловий спирт може зняти не лише багреміцини, а інші речовини, які є небажаними [149]. Отже, наступною стадією є зняття багреміцинів з аніону за допомогою метанольних розчинів концентрацією 20-%. Для відокремлення багреміцину А від багреміцину В використовують вищі концентрації, 50-% метанольний розчин, але оскільки дані антибіотики будуть виготовлятися разом, додаткове відокремлення недоцільне.

Після цього, елюат вже можна сушити для одержання вже готової субстанції, тому наступною стадією є сушіння багреміцинів.

Попередній опис дав зрозуміти можливі стадії виділення та очистки багреміцинів, які є наступними:

- Відокремлення біомаси та супернатанту один від одного
- Екстракція супернатату та біомаси різними екстрагентами
- Сушіння недоочищених екстрактів
- Розчинення висушених екстрактів
- Нанесення розчину з багреміцинами на аніоніт
- Елюювання багреміцинів розчинами метанолу
- Сушіння багреміцинів до готової субстанції.

4.1. Обґрунтування стадії відокремлення біомаси та супернатанту

Цей процес можна здійснити 4 існуючими методами: фільтрація, флотація, сепарація та центрифугування. Фільтрування – самий простий процес із всіх зазначених, оскільки за малих об'ємів не потребує додаткового обладнання, а лише фільтрувальний папір. До промислових апаратів відносять мембранні установки, які оснащуються відповідними фільтрами. В загальному керамічними. Основними недоліками цієї технології є час за який відбувається фільтрування, а також забивання фільтрів час від часу. До того ж, в залежності від технологічного процесу фільтри треба або постійно регенерувати або постійно замінювати, що здорожчує цю технологію і робить не дуже привабливою [150].

Флотація – метод, який найчастіше за все використовується для кормвих дріжджів. Цей процес передбачає спінення культуральної рідини, а більша частина біомаси при цьому знаходиться в піні. При цьому, методи флотації є доволі дорогавартісними та потребують додаткової підготовки повітря для спінення. Також, даний метод може не підійти для запропонованого виробництва, оскільки біомаса представлена міцелієм стрептоміцету, який навряд чи буде знаходитись у пінній фазі [150].

Центрифугування - найпопулярніший метод відокремлення біомаси від супернатанту. Центрифуги використовуються у випадку, коли процес потребує безперервності. Оскільки за один цикл культуральної рідини виходить дуже багато, гарним варіантом вирішення цього питання є саме проточні центрифуги, які працюють безперервно. Істотний недолік центрифуг – негативна дія на клітини відцентрової сили та їх перегрівання, але для запропонованого виробництва це не є проблемою, оскільки біомасу в подальшому будуть піддавати руйнації [150].

За подібним принципом працюють і сепаратори, які є різновидом центрифуг. Проте, вони мають великий недолік перед класичними центрифугами. Це швидка забиваємість мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями [150].

Тому, спираючись на вищенаведену характеристику пропонується обрати звичайний метод центрифугування. З врахуванням об'єму культуральної рідини за цикл, це має бути центрифуга проточного типу.

4.2. Обґрунтування розчинів для екстракції супернатанту та біомаси

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 [150].

Отже, з основної статті можна зробити висновок, що багреміцини розчинні у етилацетаті та метанолі [5,146].

Етилацетат – це естер. Його екстрагуюча дія пояснюється тим, що він утворює водневі зв'язки з гідрофільними групами. Отже, звідси висновок, що багреміцини нерозчинні у воді. При цьому не виключена наявність аналогічних “містків” з молекул води, адже її концентрація в екстракті є досить високою [151], тому етилацетилен не повністю очищує багреміцини від домішків, що потребує подальших дій для очистки.

При екстракції частково розчинними у воді естерами (етилацетат) також спостерігається висока екстракційна здатність, що можна пояснити відсутністю самоасоціації та екрануванням алкільними замісниками атомів оксигену та подвійних зв'язків [151].

Отже, з врахуванням того, що немає додаткової інформації, для екстрагування супернатанту пропонується залишити етилацетат. Варто зазначити, що супернатант необхідно попередньо упарити. Через великий об'єм рідини варто обрати саме вакуум-випарну устаовку, а не ультрафільтраційну, тому що вона буде швидше випаровувати рідину та не буде потребувати додаткової обробки фільтрів [151].

Спирти як екстрагенти поступаються кетонам у здатності концентрувати барвники. Причиною зниження екстракційних властивостей спиртів може бути їхня здатність до самоасоціації, що, в свою чергу, зменшує ймовірність утворення водневих зв'язків з молекулою барвника. Відомості про застосування перших двох гомологів спиртів для екстракції барвників у літературі відсутні. Натомість найширшого застосування набули ізопропіловий та ізобутиловий спирти. Екстракційна активність спиртів залежить насамперед від їхньої полярності (йдеться лише про екстракцію полярних речовин з іншого полярного

середовища). Наприклад, найбільш полярний ізопропіловий спирт практично повністю вилучає харчові барвники [151].

Метанол є найбільш часто використовуваним екстракційним розчинником через його високу полярність, яка може забезпечити високий вихід екстракції. Порівняно з етанолом, метанол має нижчу температуру кипіння, вищу летючість і вищу ефективність екстракції. Метанол, крім екстракції, також приводить до лізису клітини. Тобто, застосування цього розчиннику дозволяє не використовувати додаткові методи руйнування клітини, що частково заощаджує час, реагенти та гроші [152-154].

На жаль, інформації щодо розчинності багреміцинів в інших розчинниках, які можуть використовуватись для екстракції, відсутня. Відомо, що феровердини розчинні в метанолі, етанолі, ацетоні, етиловій кислоті, диметилсульфоксиді та нітрометані, але це не може дати повної гарантії того, що багреміцини мають таку ж саму розчинність, хоча речовини й дуже подібні один одному. Феровердин нерозчинний у воді, бензолі, петролейному ефірі, хлороформі та чотирьохлористому вуглеці. Враховуючи наше припущення щодо нерозчинності багреміцину у воді, дане твердження лише частково може його підтвердити [155,156].

Враховуючи відсутність іншої інформації щодо можливої екстракції багреміцинів [5,147,157], а також наявність подібної інформації щодо екстрагентів в інших роботах з цими антибіотиками, пропонується залишити розчинники незмінними, а отже використовувати етилацетат для екстракції супернатанту, а метанол – для екстракції біомаси.

Варто передбачити також відокремлення клітинної маси від метанольного екстракту, оскільки його обробляють декілька разів. З врахуванням п.4.1. найкращим способом буде знову ж таки використання центрифуги.

4.3. Обґрунтування методу сушіння екстрактів багреміцинів

Оскільки багреміцини мають низьку концентрацію в екстрактах. Перед їх сушінням варто передбачити концентрування. Розчинники, що використовуються

для екстракції (етилацетат та метанол), можна регенерувати, що дозволяє заощадити певну кількість коштів на їх повторну закупку. Для їх відокремлення метод упарювання не підходить для концентрування, оскільки всі розчини просто випаруються, що буде відведено на знешкодження повітряних відходів, або буде потребувати додаткового обладнання на конденсацію. Другим за поширенням методом концентрування є прогонка розчину через ультрафільтраційну установку, яка дозволяє одразу сконцентрувати відповідний розчин. А також отримати пермеат з розчинником, який можна віддавати на регенерацію. Також, ультрафільтраційна установка менше за габаритністю з вакуум-випарною, що безумовно є гарною перевагою цього обладнання. Тому, для концентрування, пропонується використати саме її, для подальшої регенерації етилацетату та метанолу [150].

Сушіння недоочищених екстрактів багреміцинів в більшості статей [5,146] пропонують здійснювати у вакуум-випарній установці при кімнатній температурі або при більш високій, 40°C. Така температура пояснюється тим, що при зниженні тиску знижується і температура сушіння [158]. Тому сушильні апарати, які працюють за тиском нижче за атмосферний і мають таку популярність. Точка плавлення багреміцинів при цьому становить 300 °C [5]. Температура плавлення речовини є важливим показником, оскільки на нього орієнтуються при виборі режиму висушування бажаної речовини. Максимальна температура сушки повинна бути на 30 - 40 °C нижче температури плавлення речовини. Отже, для сушіння багреміцинів потрібно забезпечити 260-270 °C [159,160].

Наразі у світі існують камерні сушильні установки, які можуть досягати таких температур та вище. Для промислового сушіння великих об'ємів вони не підходять через свій малий об'єм і відсутність проточності, але, оскільки попередньо відбувається концентрування екстрактів, дані сушильні апарати можуть ідеально підійти для наших потреб, оскільки видають температуру від 100 до 1200 °C і навіть більше [161].

Тому, пропонується обрати камерну сушарку для сушіння концентратів багреміцинів, що можуть забезпечити відповідний температурний режим. Щодо температури сушіння, пропонується обрати усереднене значення сушіння, що становить 265 °С.

4.4. Обґрунтування розчиннику недочищених багреміцинів

Як було раніше зазначено, інформація щодо розчинників багреміцинів дуже обмежена. В роботах [5,146,157] багреміцини на цій стадії розчиняють у дихлорметані. Це може бути пов'язано з тим, що далі проводять елюцію метанолом. У поєднанні цих розчинників відмічається високий рівень сольватації [162].

Сольватація — взаємодія між частинками (йонами, молекулами) розчинника й розчиненої речовини. Зумовлена електростатичними та ван-дер-ваальсовими силами (неспецифічна сольватація), а також Н-зв'язками та координаційним хімічним зв'язком (специфічна сольватація). Сольватація — найважливіший чинник, який зумовлює розчинність речовин, їх розподіл між фазами, електролітичну дисоціацію, хімічні реакції у розчинах [162].

Сольватація є невід'ємною частиною елюювання в рідинній хроматографії. Адсорбція розчинників дозволяє елюювати розчинену речовину з поверхні адсорбенту. Тенденція до адсорбції молекул розчинника на поверхні нерухомої фази призводить до сили елюювання розчинника. Тому знання та розуміння процесу сольватації є вирішальними для розуміння механізму утримування розділення рідинною хроматографією [162].

Наразі, за вищевказаною інформацією відомо, що багреміцини розчинні в метанолі. А тому, використання цього реагенту для елюції очевидне. З врахуванням сольватації, варто залишити дихлорметан для розчинення недоочищених екстрактів багреміцинів.

4.5. Обґрунтування аніоніту для нанесення розчину багреміцинів

Застосування носіїв для ВЕРХ є недоцільним, оскільки потрібна х велика кількість, при тому, що вони мають високу вартість. Як альтернативу

пропонується використати аніоніт, який використовується для очистки антибіотиків. Аніоніт представлені поліосновами. В загальному це різноманітні полімери [163].

Аніонообмінні смоли (наприклад, полістиролсульфонат натрію або полі(2-акриламідо-2-метил-1-пропансульфонова кислота) широко вивчали для використання як адсорбентів карбонових кислот, у тому числі молочної, лимонної, фумарової та оцтової. Загалом, недисоційована кислота адсорбується на полімерних смолах слабкої або сильної основи, що містять третинні або четвертинні амінні групи, а адсорбовані молекули кислоти пізніше елююються або десорбуються метанолом, аміаком або H_2SO_4 . Десорбція водяною парою також можлива, але вихід відновлення зазвичай нижчий за 70%. У процесі адсорбції зазвичай використовуються наповнені колони, що працюють у періодичному режимі, хоча також вивчалися безперервні процеси з використанням псевдозріджених та імітованих рухомих шарів [138–140]. Інші матеріали, включаючи активоване вугілля, полівінілпіридин і силікаліт (цеоліт) молекулярні сита, також були вивчені для адсорбції молочної кислоти. Порівняно з екстракцією розчинником, адсорбція є дорожчою, і тому не використовується в промисловості [164].

Для аніонних смол регенерація зазвичай включає обробку смоли сильноосновним розчином, напр. водний гідроксид натрію. Під час регенерації хімічний регенерант пропускається через смолу, і захоплені негативні іони вимиваються, відновлюючи обмінну здатність смоли [164].

Отже, оскільки багреміцини синтезуються на основі пара-кумарової кислоти, варто обрати аніоніт для їх виділення. Для цього можна використати сополімер стирол-дивінілбензол, який доволі часто використовується при елюції метанолом [164].

4.6. Обґрунтування розчину для елюції багреміцинів

Для одержання багреміцинів у роботах [5,146] використовують 20-% метанол. Як відомо з вищенаведеної інформації, багреміцини є розчинними в

метанолі, проте застосування високої концентрації не дасть необхідного результату для очистки цих речовин [149].

Іншої інформації стосовно розчинів для елюції немає, а оскільки до цього було обрано дихлорметан як розчинник, змінювати метанол буде недоречно. Отже, залигаємо 20-% метанол для елюції.

4.7. Обґрунтування сушіння очищених багреміцинів

Як було зазначено в п.4.3., для сушіння багреміцинів доречно використовувати камерну сушильну шафу. Тому, для цієї стадії вибір залишаємо незмінним.

4.8. Обґрунтування регенерації використаних розчинів

Під час виробництва багреміцинів варто передбачити регенерацію етилацетату, оскільки він використовується у великій кількості. Його регенерують методом дистиляції [165]. Щодо метнолу, його регенерують методом ректифікації [166]. Ректифікація та дистиляція дещо подібні методи, проте мають певні відмінності. По суті, ректифікація є різновидом дистиляції: поділ рідин також відбувається за допомогою кипіння та конденсації, але складнішим способом. Різниця в тому, що частина конденсату повертається назад в перегінну ємність, рухаючись в колоні ректифікації назустріч парам, що піднімаються. Це призводить до того, що домішки, які містяться в парі, що піднімаються, перетворюються в конденсат і теж повертаються в перегінну ємність. Все це повторюється багато разів і в результаті конденсат очищується практично від усіх сторонніх домішок, перетворюючись на чистий ректифікат. Дистиляція – перегонка або випаровування рідини, її подальше охолодження і конденсація парів [167,168].

РОЗДІЛ 5

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 7,98 м³;
2. Концентрація біомаси *Streptomyces sp. Tii 4128* в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 8 г/л;
3. Концентрація багреміцинів ($C_{баг}$) = 12 мг/л;
3. Втрати на стадіях виділення і очищення багреміцинів = 30%.

Початкова кількість багреміцинів в культуральній рідині складає $12 \cdot 7,98 \approx 95,76$ г, а кінцева кількість багреміцинів, з урахуванням 30 %-ів втрат, має становити 67 г. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 5.1.

НУХТ БТЕК 02.02.4 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вергун Ю.В.			Розділ 5 Підбір технологічного обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					91	170
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

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 2 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 2 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	7,98 м ³	-	7,98 м ³	Збірник культуральної рідини об'ємом 10 м ³
ТП 3 Центрифугування культуральної рідини						
2	ТП 3 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	7,98 м ³	-	-	Розпилююча сушарка об'ємом 3 м ³
		Біомаса	8 г/л	-	63,84 кг	В збірник на 200 л
		Супернатант	-	1%	7837 л	В збірник об'ємом 10 м ³
ТП 4 Екстрагування біомаси						
3	ТП 4 Екстрагування біомаси в метанолі	Біомаса	63,84 кг	-	-	В збірнику на 200 л
		Метанол	200 л (3 рази по 67 л)	-	-	
		Міцеліальний екстракт	-	2%	196 л	В збірник об'ємом 250 л
ТП 5 Концентрування екстракту біомаси в ультрафільтраційній установці						
4	ТП 7 Концентрування екстракту біомаси в ультрафільтраційній установці	Міцеліальний екстракт	196 л	-	-	В ультрафільтраційній установці
		Метанольний пермеат	-	-	189,6	На регенерацію
		Концентрований міцеліальний екстракт (в 30 раз)	-	1%	6,4 л	До збірнику на 15 л

ТП 6 Сушіння концентрованого міцеліального екстракту						
5	ТП 6 Сушіння концентрованого міцеліального екстракту	Концентрований міцеліальний екстракт	6,4 л	-	-	В камерній сушарці об'ємом 20 л
		Сухий порошок недоочищеного багреміцину з міцеліального екстракту	-	1%	8,5 г	До лабораторної склянки на 1 л
ТП 7 Упарювання супернатанту						
6	ТП 7 Упарювання супернатанту в вакуум-випарній установці	Супернатант	7837 л	-	-	Вакуум-випарний апарат на 10 м ³
		Упарений супернатант (в 10 раз)	-	1%	775,9 л	В збірник об'ємом 1 м ³
ТП 8 Екстрагування супернатанту						
7	ТП 6 Екстрагування супернатанту етилацетатом	Упарений супернатант	775,9 л	-	-	В збірнику об'ємом 1 м ³
		Етилацетат	400 (3 рази по 133,3 л)	-	-	
		Відпрацьований розчин	-	-	779,9 л	На утилізацію
		Етилацетатний екстракт супернатанту	-	2%	396 л	В збірник об'ємом 250 л
ТП 9 Концентрування екстракту супернатанту в ультрафільтраційній установці						
8	ТП 9 Концентрування екстракту супернатанту в ультрафільтраційній установці	Етилацетатний екстракт супернатанту	396 л	-	-	В ультрафільтраційній установці
		Етилацетатний пермеат	-	-	388,2 л	На регенерацію
		Концентрований екстракт супернатанту (в 50 разів)	-	1%	7,8 л	До збірнику на 15 л
ТП 10 Сушіння концентрованого екстракту супернатанту						
9	ТП 10 Сушіння концентрованого екстракту супернатанту	Концентрований екстракт супернатанту	7,8 л	-	-	В вакуум-сушильний шафі об'ємом 20
		Сухий порошок недоочищеного багреміцину з екстракту супернатанту	-	1%	76,6 г	До лабораторної склянки на 1 л

ТП 11 Розчинення порошку в дихлорметані						
11	ТП 9 Розчинення порошку багреміцинів в дихлорметані	Сухий порошок недочищених багреміцинів	85,1 г (76,6 г+8,5 г)	-	-	В хімічній склянці на 1 л
		Дихлорметан	900 мл	-	-	
		Розчин багреміцинів у дихлор метані	-	-	0,9 л	В скляну посудину на 1 л
ТП 12 Нанесення розчину багреміцинів на катіоніт						
12	ТП 10 Нанесення розчину багреміцинів на аніоніт	Розчин багреміцинів у дихлор метані	0,9 л	10%	0,81 л	Іонообмінна колонка на 2 л
		Сополімер стирол-дивінілбензол	92 г	-	-	
ТП 13 Елюювання багреміцинів						
13	ТП 11 Елюювання багреміцинів за допомогою метанолу	Зв'язані багреміцини на катіоніті	76,6 г	-	-	Катіонообмінна колонка на 2 л
		Метанол 20-%	2 л	-	-	
		Елюат багреміцинів	-	8%	1,8 л	В скляну ємність на 2 л
ТП 14 Сушіння чистого порошку						
14	ТП 12 Сушіння чистого порошку багреміцинів	Елюат багреміцинів	1,8 л	-	-	В конвективній лабораторній сушці
		Сухий порошок	68,3 г	2%	67 г	В скляну ємність на 100 мл

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ
БАГРЕМІЦИНІВ

Специфікація апаратурного обладнання для одержання багреміцинів з біомаси і культуральної рідини *Streptomyces sp.* Тії 4128 продемонстровано в табл.6.1

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання виробництва багреміцинів з *Streptomyces sp.*

Тії 4128

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр G4. Панельний повітряний фільтр складається з сталеві оцинкованої рамки, всередині якої покладено об'ємний фільтруючий матеріал, що складається з шару відкритопористого пінополіуретану. Країна: Україна. Бренд: ВЕНТ-ФИЛЬТР ¹
Ф-3	Фільтр тонкої очистки	1	Кишеньковий фільтр ФЯК 592х490х600-8 F9. Зроблений з рамки з оцинкованого профілю та фільтруючого матеріалу із синтетики у формі кишень. Країна: Україна. Торгова марка: АС ФИЛЬТР ²
Ф-4	НЕРА фільтр	1	НЕРА фільтр 305*610*78 H14 ФяС. Виготовлений з використанням високоякісного фільтрувального матеріалу з ультратонких та мікротонких скляних волокон, упакованого у вигляді дрібних складок (мінігофр), розділених термопластичними або алюмінієвими сепараторами. Країна: Україна. Торгова марка: TECHNO-PARTS ³
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач рідинний. Мінімальний робочий тиск – 10 бар. Нагрівач – термоолія.Робоча температура до 400 °С. Країна: Україна. Торгова марка: ОПЭКС ЭНЕРГОСИСТЕМЫ ⁴

НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Вергун Ю.В.			
Перевір.	Буценко Л.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАГРЕМІЦИНІВ				
		Лім.	Арк.	Аркушів
			88	138
Кафедра БТМ				

3-6 3-9	Збірник для зберігання культуральної рідини Збірник для зберігання супернатанту	2	Збірник на 10 м ³ , оснащений подвійною сорочкою. Матеріал корпусу виготовлено зі сталі нержавіючої 304L (не контактуючі поверхні) та 316L (контактуючі поверхні). Збірник може оснащуватись мішалкою з швидкістю до 155 об/хв. Габарити: висота 3600 мм, діаметр 1900 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Wenzhou Suote Pharmaceuticall And Chemical Engineering Co., Ltd. ⁵
Н-7 Н-19 Н-21 Н-37	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий, багатоступінчастий Pedrollo 2CP32/200С. Продуктивність - 15 м ³ /год. Максимально робоча температура + 40 °С. Матеріал корпусу – чавун. Робоче колесо – нержавіюча сталь. Країна: Італія. Торгова марка: Pedrollo ⁶
Ц-8	Проточна центрифуга промислова	1	Промислова проточна центрифуга безперервного типу LLW-450. Продуктивність – до 12 м ³ /год. Швидкість ротора – до 10000 об/хв. Габарити: довжина 1400 мм, висота 2050 мм, ширина 1450 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Hunan Zhongyi Centrifuge Co.,Ltd ⁷
3-10	Збірник для зберігання біомаси	1	Реактор об'ємом 200 л LH-200L. Виготовлено з нержавіючої сталі S31603. Відповідає всім вимогам GMP. Оснащений сорочкою. Швидкість перемішування до 85 об/хв. Габарити: висота 700 мм, діаметр 600 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Yangzhou Lianhe Chemical Machinery Co., Ltd. ⁸
Д-11	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор deeterflow®. Продуктивність 5 л/хв. Оснащений трубою діаметром 8 мм. Робочий тиск від 0,2 до 10 бар. Робоча температура від 0°С до +65°С. Країна: Англія. Торгова марка: Deeter Electronics Ltd. ⁹
Н-12 Н-15 Н-24 Н-26 Н-33	Перистальтичний насос	5	Насос PTL17. Продуктивність від 129 до 908 л/год. Робоча температура 0-60°С. Робочий тиск до 4 бар. Країна: Україна. Торгова марка: TAPFLO ¹⁰
Ц-13	Проточна центрифуга	1	Проточна центрифуга GF/GQ105. Продуктивність – 300-500 л/год. Максимальна швидкість ротора – 19000 об/хв. Робочий тиск 0,05 МПа та більше. Габарити: довжина 600 мм, висота 1000 мм, ширина 1600 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Liaoyang Hongji Machinery Co., Ltd ¹¹

3-14 3-32 3-35	Збірник для зберігання міцеліального екстракту Збірник для зберігання відпрацьованого метанольного розчину Збірник для регенерованого метанолу	3	Збірник об'ємом 250 л КМС 250. Виготовлений з хімічної нержавіючої сталі. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Габарити: висота 600 мм, діаметр 700 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Wuxi Kemike Equipment Technology Co., Ltd. ¹²
УФ-16 УФ-27	Ультрафільтраційна установка	2	Ультрафільтраційна установка КУУФ-ЗТРН. Продуктивність 3000 л/год. Має можливість встановлення керамічного фільтру. Країна: Китай. Торгова марка: Kaiyuan ¹³
3-17 3-28	Збірник для зберігання концентрату міцеліального екстракту Збірник для зберігання концентрату екстракту з супернатанту	2	Лабораторний збірник об'ємом 15 л. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Має колеса на ніжках, а отже є пересувним. Матеріал корпусу – нержавіюча сталь. Країна: Україна. Торгова марка: ХімМікс ¹⁴
С-18 С-29 С-31	Камерна сушарка	3	Камерна сушарка РР 20/65. Сушильний агент – нагріте повітря. Робоча температура 200-600 °С. Габарити: довжина 1000 мм, висота 650 мм, ширина 800 мм. Об'єм завантаження – 20 л. Країна: Чехія. Торгова марка: LAC ¹⁵
В-20	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установка ВМ253Т. Продуктивність до 2,5 м ³ /год. Габарити: довжина 5000 мм, висота 8300 мм, ширина 2600 мм. Країна: Україна. Торгова марка: Нежинский механический завод ¹⁶
3-22	Збірник для екстрагування супернатанту етилацетатом	1	Реактор об'ємом 1000 л LH-1000L. Виготовлено з нержавіючої сталі S31603. Відповідає всім вимогам GMP. Оснащений сорочкою. Швидкість перемішування до 85 об/хв. Габарити: висота 2300 мм, діаметр 1400 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Yangzhou Lianhe Chemical Machinery Co., Ltd. ⁸
Д-23	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор SK52QMF111B(HD). Швидкість розливу – 180 л/хв. Робоча температура -25°С - +55°С. Країна: Китай. Торгова марка: Beijing Sanki Petroleum Technology Co., Ltd. ¹⁷

3-25 3-36 3-39	Збірник для зберігання екстракту з супернатанту Збірник для зберігання відпрацьованого етилацетату Збірник для регенованого етилацетату	3	Збірник об'ємом 500 л КМС 500. Виготовлений з хімічної нержавіючої сталі. Оснащений сорочкою та перемішувачем. Габарити: висота 800 мм, діаметр 700 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Wuxi Kemike Equipment Technology Co., Ltd. ¹²
К-30	Іонообмінна колонна	1	Іонообмінна колонна на замовлення. Продуктивність 500 мл/год. Відповідає всім вимогам GMP. Колонна виготовлена з нержавіючої сталі 316L. Країна: Китай. Торгова марка: Wenzhou Aowei Machinery Co., Ltd. ¹⁸
Р-34	Ректифікаційна установка	1	Ректифікаційна установка з об'ємом завантаження 200 л ACE-ZL-M187. Виготовлений з червоної міді та нержавіючої сталі. Має підключення до СІР мийки. Торгова марка: Wenzhou Ace Machinery Co., Ltd. ¹⁹
Д-38	Промислова дистиляційна установка	1	Дистиляційна установка з завантаженням на 500 л. Виконано з червоної міді. Габарити: довжина 2100 мм, висота 2500 мм, ширина 1800 мм. Країна: Китай. Торгова марка: Hangzhou Yizeyuan Machinery Technology Co., Ltd. ²⁰

Примітка: Примітка: 1 - <https://ventfilter.kiev.ua/ru/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy-4734820/>, 2 - <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyi-filtr-592kh490kh600-8-f9/>, 3 - <https://tehno-parts.com.ua/hepa-filtr-30561078-h14-fias>, 4 - https://opeks.ua/ru/zhidkostnye-kalorifery-nagrevateli-i-oxladiteli-/?utm_source=google&utm_medium=ru&device=c&utm_campaign=performance&gclid=Cj0KCQjw7uSkBhDGARIsAMCZNJt8hH8t_Nmg01d45LsPG56xUQTDtUZjk44y9okGGe9nr6OqDF45tAkaAlIfEALw_wcB, 5 - https://www.alibaba.com/product-detail/10000-litre-reactor-chemical-reactor-prices_1600185517773.html, 6 - <https://teplomarket-top.com.ua/ua/p818919233-nasos-tsentrobezhnyj-mnogostupenchatyj.html>, 7 - https://www.alibaba.com/product-detail/Horizontal-Centrifuge-LLW-Horizontal-Spiral-Continuous_60602455203.html?s=p, 8 - https://www.alibaba.com/product-detail/50L-100L-200L-6000L-industrial-bio_1600346306929.html?spm=a2700.7724857.0.0.6d6e3777t2kUHp, 9 - <https://www.deeterelectronics.com/product/deeterflow-liquid-dispensers/deeterflow-liquid-volume-dispenser/>, 10 - <https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#tekhnichni-dani>, 11 - <https://www.alibaba.com/product-detail/continuous-flow-centrifuge-60021532084.html>, 12 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/KMC-1600722356706.html?s=p>, 13 - <https://russian.rowatertreatment-system.com/sale-14454248-1000l-h-pvdf-uf-membrane-ultrafiltration-system-with-hollow-fiber-ultra-filtration-plant.html>, 14 - <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratoryj-reaktor-15-l>, 15 - <https://www.lac.cz/ru/pechi-i-sushilki/pech-dlya-otpuska-pp>, 16 - <https://www.oborud.info/product/jump.php?23223&c=1652>, 17 - <https://sankichina.en.made-in-china.com/product/GSHmcjJrUK/China-Hi-Flow-Fuel-Dispenser-Fuel-Pump->

[with-100-120-L-Min-Flow-Rate.html](#), 18 - https://www.alibaba.com/product-detail/Resin-Ion-Exchange-Column-To-Produce_60805352795.html?s=p , 19 - https://www.alibaba.com/product-detail/Distillation-Column-Still-50L-100L-200L_1600696203671.html, 20 - https://www.alibaba.com/product-detail/-JiangMan-3500L-Whiskey-Distillery-Equipment_62006366863.html

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАГРЕМІЦИНІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Для виділення та очищення багреміцинів використовується низка реагентів, які можна закупити, це метанол, етилацетат та аніоніт. Проте, елюювання відбувається за допомогою 20-% розчину метанолу, який треба додатково передбачити, а регенерація смол – за допомогою 4-% розчину гідроксиду натрію [163], який також варто приготувати. Також, в технологічній та апаратурній схемах варто передбачити регенерацію етилацетату, оскільки використовується його велика кількість. Крім цього, для сушіння використовуються камерні сушильні шафи, а тому потрібно передбачити підготовку гарячого повітря.

ДР 1. Підготовка гарячого повітря для камерних сушильних шаф

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник ПЗ-1 на висоті 10 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною. Таке рішення дозволяє зменшити навантаження на систему очистки та підігріву повітря від великої кількості сміття, що дозволяє подовжити термін експлуатації виробничого обладнання.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Дану операцію виконують з метою уникнення потрапляння додаткового бруду. Оскільки повітря готується як для сушіння недоочищених екстрактів, так і для отового порошку багреміцинів, варто передбачити доволі чисте повітря, тому що багреміцини будуть використовуватись у порошку для ін'єкцій. Очистку повітря від пилу та механічних часток здійснюють у фільтр класу очистки G4 (Ф-2), з затримуючою здатністю 90%.

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	Вергун Ю.В.				РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАГРЕМІЦИНІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ		
<i>Перевір.</i>	Буценко Л.М.						
<i>Реценз.</i>							
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>	Стабніков В.П.						
					<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
						93	138
					Кафедра БТМ		

ДР 1.3. Тонка очистка повітря

Задля зниження мікробного навантаження та кількості мікрочастинок сміття у вигляді пилу та бруду, які можуть потрапити до наступного фільтру, а також для того, щоб збільшити ступінь чистоти повітря, потрібно передбачити високу очистку повітря. Повітря пропускають через фільтр класу очистки F9 (Ф-3), з затримуючою здатністю 95%.

ДР 1.4. Надочищення повітря у HEPA фільтрі

Дана стадія є останньою перед нагріванням готового повітря. Попередня фільтрація здійснюється задля уникнення великого навантаження на цю стадію для HEPA фільтру (Ф-4), який затримує до 99,995% бруду та затримує мікроскопічний бруд та інші контамінанти з діаметром пор 0,2 мкм.

ДР 1.5. Нагрівання повітря для сушіння багреміцинів

Одержане очищене повітря нагрівають до температури 270 °С в теплообміннику (Т-5), оскільки поки воно дійде до сушильних шаф, температура знизиться на декілька градусів, тому передбачаємо нагрівання на 5 °С за необхідне. Як теплоносій використовують масляний теплоносій АМТ-300, оскільки він може нагріватись до 280 °С [169].

ДР 2. Приготування додаткових розчинів

ДР 2.1 Приготування 20-% розчину метанолу

В мірному циліндрі на 500 мл відміряють 400 мл метанолу. Після цього, спирт виливають у скляну колбу на 2 л. До спирту доливають 1600 мл дистильованої води, відміряної за допомогою мірного циліндру на 2 л. Одержаний розчин ретельно перемішують та закривають гумовою пробкою задля уникнення випаровування метанолу. Колбу передають до ТП 14.

ДР 2.2. Приготування 4-% гідроксиду натрію

Для регенерації аніоніту треба передбачити 90 мл реагенту. Пропонується приготувати 100 мл (тобто 10 мл про запас). На технічних вагах зважують 4 г гідроксиду натрію та вносять у конічну колбу на 250 мл. Після цього, за допомогою мірного циліндру на 100 мл до лугу доливають 96 мл води

дистильованої. Вміст колби перемішують до повного розчинення та передають до ТП 14.

ТП 3. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у збірнику (З-6) при 4-8 °С для подальшого виготовлення відповідних препаратів. Підтримка температури здійснюється за допомогою подачі охолодженої води до сорочки збірника.

ТП 4. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину за допомогою відцентрового насосу (Н-7) з продуктивністю 15 м³/год подають до проточної промислової центрифуги (Ц-8). Встановлюється швидкість ротора – 8000 об/хв. Відокремлений супернатант подається до збірника (З-9) об'ємом 10 м³, а біомасу збирають після закінчення центрифугування. Біомасу передають до збірника (З-10) об'ємом 200 л. Тривалість процесу становить 1 годину.

ТП 5. Екстрагування біомаси в метанолі

До збірника (З-10) де міститься біомаса за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-11) наливають 67 л чистого метанолу. Після цього, вміст збірника перемішують за допомогою мішалки при 200 об/хв протягом 1 години. Після цього, залишають розчин у спокої протягом 2 годин при кімнатній температурі. Під час процесу рН не контролюють. Потім, одержану суміш подають за допомогою перистальтичного насосу (Н-12) на проточну центрифугу (Ц-13), встановлюється швидкість ротора – 10000 об/хв, а час відокремлення – 30 хв. Метанольний екстракт, що було відокремлено, подають до збірника (З-14), а клітинний залишок вручну вивантажують назад до збірника (З-10). З клітинним залишком повторюють всі ті ж самі маніпуляції з додаванням метанолу та відокремленням ще двічі (тобто, дану стадію потрібно повторити 3 рази).

ТП 6. Концентрування екстракту біомаси в ультрафільтраційній установці

Зі збірника (З-14) за допомогою перистальтичного насосу (Н-15) до ультрафільтраційної установки (УФ-16) подається міцеліальний розчин. В

установку попередньо встановлюють керамічний фільтр з діаметром пор 0,26 кДа [5]. Ступінь концентрування становить 30 разів, його тривалість – 2 год. Одержаний пермеат перекачується до збірнику (З-31). Пермеат передають на регенерацію до *ТП 16*. А концентрат перекачується перистальтичним насосом, що передбачено в системі ультрафільтраційної установки до збірнику (З-17).

ТП 7. Сушіння концентрованого міцеліального екстракту

Зі збірнику (З-17) вручну розливають концентрат на деко. Після цього, деко встановлюють до камерної сушарки (С-18). До сушарки підводиться повітря від *ДР 1.5*. Встановлюється температура 265 °С. Тривалість сушіння – 5 годин. Після цього, сухий порошок зважують на лабораторних вагах, він має важити 8,5 г, та пересипають у хімічну склянку на 1 л та передають до *ТП 12*.

ТП 8. Упарювання супернатанту в вакуум-випарній установці

Супернатант зі збірника (З-9) за допомогою відцентрового насосу (Н-19) подають до вакуум-випарної установки (В-20). Після чого, супернатант упарюють в 10 раз при температурі 25 °С. Тривалість процесу становить 5 год. Після чого, упарений екстракт подають до збірнику (З-22) за допомогою відцентрового насосу (Н-21).

ТП 9. Екстрагування супернатанту етилацетатом

До збірнику (З-22) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-23) наливають 133,3 л етилацетату. Після цього, вист збірнику перемішують за допомогою мішалки при 200 об/хв протягом 1 години. Екстрагування триває 2 години при кімнатній температурі. Після цього, нижню фракцію зливають до каналізації. З розчином, що залишився у збірнику (З-22) повторюють ті самі маніпуляції ще 2 рази (тобто, 3 повтори за всю стадію). Після всіх повторів, одержаний екстракт за допомогою перистальтичного насосу (Н-24) передають до збірнику (З-25).

ТП 10. Концентрування екстракту супернатанту в ультрафільтраційній установці

Зі збірника (З-25) за допомогою перистальтичного насосу (Н-26) до ультрафільтраційної установки (УФ-27) подається екстракт супернатанту. В установку попередньо встановлюють керамічний фільтр з діаметром пор 0,26 кДа [5]. Ступінь концентрування становить 50 разів, його тривалість – 5 год. Одержаний пермеат перекачується до збірника (З-36). Пермеат передають на регенерацію до ТП 17. А концентрат перекачується перистальтичним насосом, що передбачено в системі ультрафільтраційної установки до збірника (З-28).

ТП 11. Сушіння концентрованого екстракту супернатанту

Зі збірника (З-28) вручну розливають концентрат на деко. Після цього, деко встановлюють до камерної сушарки (С-29). До сушарки підводиться повітря від ДР 1.5. Встановлюється температура 265 °С. Тривалість сушіння – 5 годин. Після цього, сухий порошок зважують на лабораторних вагах, він має важити 76,6 г, та пересипають у хімічну склянку на 1 л, де вже знаходиться інший сухий залишок від ТП 6 та передають до ТП 11.

ТП 12. Розчинення порошку багреміцинів в дихлорметані

До сухих компонентів від ТП 6 та ТП 10, що знаходяться в лабораторній склянці об'ємом 1 л, за допомогою мірного циліндру на 1 л доливають 900 мл дихлорметану. Суміш ретельно перемішують до повного розчинення порошку.

ТП 13. Нанесення розчину багреміцинів на аніоніт

На колонку (К-30) попередньо наносять сополімер стирол-дивінілбензол. Після чого, на смолу наносять близько 0,9 л розчину від ТП 11.

ТП 14. Елюювання багреміцинів за допомогою метанолу

До колонки під'єднують 20-% метанол від ДР 1.1 та елюють розчин при швидкості розчину 500 мл/год. Тривалість елюювання становить 4 години. Після цього, до колонки під'єднують 4-% розчин гідроксиду натрію (від ДР 1.2) для регенерації смоли зі швидкістю 1,5 мл/хв, а тривалість регенерації – 1 год [170,171].

ТП 15. Сушіння чистого порошку багреміцинів

Елюат переносять до камерної сушильної шафи (С-31). Встановлюється температура в 265 °С. Тривалість сушіння – 5 годин. Відносна вологість порошку має становити 1%. Одержаний сухий порошок збирають в скляну ємність об'ємом 100 мл. Попередньо, потрібно визначити вагу, вона має становити 68,5 г.

ТП 16. Регенерація метанолу

Зі збірника (З-32) до промислової ректифікаційної колони (Р-34) за допомогою перистальтичного насосу (Н-33) подається однорідна суміш, що містить етилацетат. Встановлюється температура 64,7 °С [165]. Тривалість дистиляції – 3 годин. Одержаний метанол переноситься до збірника (З-35) та використовується повторно для стадії ТП 5.

ТП 17. Регенерація етилацетату

Зі збірника (З-36) до промислової дистиляційної установки (Д-38) за допомогою відцентрового насосу (Н-37) подається однорідна суміш, що містить етилацетат. Встановлюється температура 77,2 °С [172]. Тривалість дистиляції – 7 годин. Одержаний етилацетат переноситься до збірника (З-39) та використовується повторно для стадії ТП 9.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БАГРЕМІЦИНІВ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

8.1. Вимірювання концентрації гідроксиду натрію

Для вимірювання концентрації використовуються концентратоміри. Ці девайси призначені для точного визначення концентрації різних розчинів, що застосовуються у технологічних процесах. Вимірювання концентрації ґрунтується на визначенні електропровідності розчинів і проводиться за допомогою кондуктивних або індуктивних датчиків (електродів), що працюють з вторинними приладами [173].

Функціонально промисловий концентратомір складається з двох блоків: вимірювального електрода та вторинного приладу, який здійснює функції індикації, регулювання та передачі даних. Конструктивно ці блоки можуть бути виконані в одному корпусі (компактне виконання) або мати рознесене виконання, коли електрод за допомогою спеціального кабелю підключається до вторинного приладу [173].

Для наших цілей вистачить лабораторного вимірювача концентрації кислоти або лугу SX5150. Діапазон вимірювання – від 0 до 15%. Точність становить $\pm 0,2\%$. Межа поділки – 0,01%. Електродом виступає ND800-S кислотно-лужної електрод. Вимірювання може проходити в 4 значеннях: відсотки, молі на літр, грами на літр, грами на сантиметр кубічний [174]. Концентрація має становити 4%.



					107
					<i>НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ</i>
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	
<i>Розроб.</i>	<i>Вергун Ю.В.</i>				РОЗДІЛ 8
<i>Перевір.</i>	<i>Буценко Л.М.</i>				КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА
<i>Реценз.</i>					БАГРЕМІЦИНІВ ДЛЯ
					Літ. Арк. Аркушів
					99 170

Рис.8.1. Концентратомір SX5150 [174]

8.2. Вимірювання градусу метанолу

Для визначення градусу метанолу, або ж його відсотковості можна використовувати ареометр. Для аналізу використовують мірний циліндр на 100 мл, до якого наливають розчин для аналізу. В циліндр опускають ареометр. По поділці визначають градус аналізованого розчину. Розчин має становити 20° (20%). При цьому варто використати ареометр АСП-3 0-40% [175].



Рис.8.2. Набор ареометрів АСП-3 [175]

8.3. Контроль ваги кінцевої продукції

Вагу кінцевої субстанції контролюють за допомогою технічних вагів. Для цього можна використати ваги ТВЕ-0,5-0,01-а-2. Ціна поділки - 0,01 г. Максимально допустима вага – 500 г. Платформа – діаметр 120 мм. Самокалібруючі [176]. Кінцева вага субстанції має становити 68,5 г.



Рис.8.3. Ваги TBE-0,5-0,01-a-2 [176]

8.4. Контроль вологості кінцевої продукції

Вологість твердих тіл визначається ємкісними і кондуктометричними вологомірами. Використовують також резонансне поглинання радіохвиль НВЧ діапазону ядрами водню, що входять до складу води. При цьому виміряну фізичну величину (наприклад, діелектричну проникність) контролюваного шару вологого препарату зіставляють з еталонним зразком. Застосовуються вологоміри для вимірювання вологості проб сухих препаратів в лабораторних умовах, а також вологоміри для контролю вологості сухих препаратів в технологічному потоці, наприклад, на стрічковому конвеєрі. Методика полягає в тому, що перед вісушуванням, препарат зважують, після чого сушать до абсолютно сухої маси і вимірюють вагу кінцевого сухого продукту. Вираховують різницю між початковим і кінцевим значенням, після чого, переводять у %, що і означає кількість води [177].

Для визначення ваги багреміцинів можна використати ваги для визначення вологості МА 50/1.R. Найбільша межа зважування – 50 г, а найменша – 0,002 г. Діапазон температури висушування 50-160 °С. Для аналізу достатньо використати 1 г препарату. На рис. 5.4. показано апарат МА 50/1.R польського виробництва [177]. Кількість води має становити не більше 1%.



Рис.8.4. Аналізатор вологості МА 50/1.Р [177]

8.5. Контроль концентрації багреміцинів

Контроль кількості багреміцинів зазвичай виконують методом ВЕРХ, проте це доволі довго, тому, можна використати кольорову реакцію багреміцинів з анісовим альдегідом- H_2SO_4 , оскільки при цій реакції всі багреміцини випадають в осад [5].

Для проміжкового продукту, що знаходиться в екстрактах. Варто викорисовувати 10 мл зразку. До 10 мл рідкого напівпродукту доливають 8 мл $CHCl_3$ -MeOH. Потім, до 1 мл одержаної суміші додають 2 мл ацетону-циклогексану. Відбирають 1 мл і до нього доливають 1 мл анісового альдегіду- H_2SO_4 . Має утворитися стійкий осад червоного кольору [5].

Від осаду відокремлюють надосад шляхом центрифугування при 10000 об/хв протягом 5 хв. Після цього, до осаду багреміцинів додають 1 мл 20-% метанолу та повністю розчиняють його. Після цього, зразок визначають спектрофотометрично на довжині хвилі 280 нм. Одержану оптичну густину порівнюють з наявними даними по калібрувальному графіку [5].

Надосад можна відокремити за допомогою лабораторної центрифуги KAIDA KH19A. Максимальна швидкість обертів центрифуги становить 16600 об/хв, що еквівалентно 19560 g (обертובה сила центрифуги). Може оснащуватись ротором No.12, який містить 10 лунок я лабораторних пробірок об'ємом 5 мл. Максимальна швидкість ротора при цьому становить 13000 об/хв, що еквівалентно 12280 g [178].



Рис.8.5. Лабораторна центрифуга KAIDA KH19A [178]

Для спектрофотометричного визначення можна використати спектрофотометр Shimadzu UV-1900 / UV1900i. Робоча довжин хвиль апарату має діапазон від 190 до 1100 нм. Має функцію побудови калібрувальних кривих, з подальшим визначенням та перерахунком невідомої концентрації у зразку. Точність установки довжини хвилі $\pm 0,3$ нм [179].



Рис.8.6. Спектрофотометр Shimadzu UV-1900 / UV1900i [179]

РОЗДІЛ 9
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ БАГРЕМІЦИНІВ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу проти бактеріємії на основі багреміцинів та кількості серій на рік

Кількість культуральної рідини за цикл складає 7,98 м³, при цьому, 30% припадає на втрати. Тоді, за один цикл кількість багреміцинів буде еквівалентно:

$$7,98 \times 0,7 = 5,586\text{м}^3$$

Враховуючи концентрацію багреміцинів (12 мг/л) [5], за один цикл отримуємо таку кількість очищеного антибіотику:

$$5586 \times 12 = 67032\text{мг} \approx 67\text{г}$$

На одну ампулу припадає 0,18 г багреміцинів. Отже, кількість ампул на 1 серію становить:

$$\frac{67}{0,18} \approx 372\text{ампул}$$

З врахуванням того, що на одну ампулу припадає 5 мл препарату, за одну серію одержується:

$$372 \times 5 = 1860\text{мл або } 1,86\text{л}$$

Потреба в багреміцинах на рік становить 1,21 кг. Тоді, річна потужність виробництва становитиме:

112

					НУХТ БТЕК 02.02.4 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9 Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Вергун Ю.В.						
Перевір.		Буценко Л.М.					112	170
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

$$\frac{1210}{0,18} \approx 6722 \text{ампули}$$

Кількість серій на рік становитиме:

$$\frac{6722}{372} \approx 18 \text{серій}$$

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

9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Стерильні лікарські засоби необхідно виготовляти в чистих зонах. Доступ персоналу і/чи вихідної сировини, матеріалів, напівпродуктів обладнання в чисті приміщення дозволяється тільки через повітряні шлюзи. В чистих зонах необхідно підтримувати належну чистоту, що регламентується вимогами GMP, а повітря, що до них подається, повинно проходити очищення через фільтри відповідної ефективності [180].

Допоміжні операції (підготовка вихідної сировини і матеріалів, виготовлення напівпродуктів, фасування в первинну упаковку, стерилізація) необхідно проводити в окремих зонах чистого приміщення [180].

Необхідну ступінь чистоти повітря необхідно забезпечувати, базуючись на результатах валідації [180].

Згідно з вимогами GMP ВООЗ чисті приміщення для виробництва стерильної продукції класифікує у відповідності вимог до характеристик на класи чистоти А, В, С і D [180].

Запропоновано виготовляти ін'єкційний препарат, що потребує найвищого класу чистоти, а саме А. Клас А – це зони, в яких можливий безпосередній контакт з повітрям. Тут відбувається заповнення, герметизація і інші процеси, які в більшій мірі схильні до контамінації. До класу А відносять мікробіологічні

бокси, виробничі лінії, операційні і т.д. На рис.9.1. показано вимоги до А та інших класів чистоти приміщення [180].

Клас чистоти	Максимально припустиме число часток в 1 м ³		Максимальне число життєспроможних мікроорганізмів, допустиме в 1 м ³ повітря робочої зони
	0,5–5 мкм	> 5 мкм	
А (з ламінарним потоком повітря)	3500	ні	менше 1
В	3500	ні	5
С	350000	2000	100
Д	3500000	20000	500

Рис.9.1. Вимоги до різних класів чистоти приміщень [180]

Повітря виробничих приміщень – потенційне джерело забруднення ліків, тому його очищення є одним з ключових завдань підготовки виробництва. Рівень чистоти повітря, що знаходиться в приміщенні, визначає його клас [181].

Системи підготовки вентиляційного повітря слід проектувати, виходячи зі спеціальних вимог до технологічних операцій, вимог до приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів відповідно до приведеної класифікації в МР 64-1.1.-2001, керуючись галузевими документами, зокрема ГП 07.004.98, ГНД 07.006.98, МВГ 07.003.98, а також ГНД 01.001.98 [181].

Для забезпечення належного ступеня чистоти, вентиляційне повітря повинно пройти очищення за допомогою фільтрів відповідної ефективності. Для приміщень (зон), що відносяться до класів чистоти А, В і С рекомендується трьохступеневе очищення, а для класу чистоти D – двоступеневе [181].

На перших і других етапах очищення доцільно використовувати фільтри мішечного типу EU5, EU7, а для третього етапу можна використовувати фільтри HEPA. Проте, для класу чистоти А передбачається не HEPA фільтр, а фільтр типу ULPA. На рис.2.2. показано трьохступеневу схему очищення повітря для класу чистоти А [181].

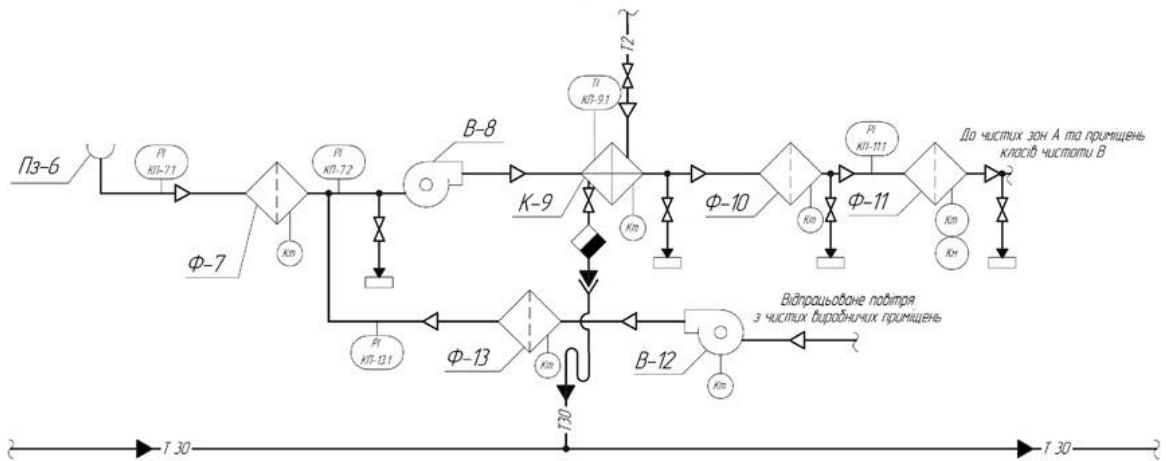


Рис.9.2. Апаратурне зображення трьохступеневої очистки повітря для класу чистоти А. Пз-6 – повітрязабірник, Ф-7 - фільтр попереднього очищення повітря, В-8 - компресор(вентилятор, повітродувка), К-9 – кондиціонер,теплообмінник для регулювання температури повітря, Ф-10 (Ф-11) – фільтр стерилізуючої фільтрації, В-12 – компресор (вентилятор, повітродувка) гілки рециркуляції, Ф-13 – фільтр стерилізуючої фільтрації гілки рециркуляції [181].

Тож, в графічній частині цієї роботи буде наведено саме 3 ступенева очистка повітря, яка буде закінчуватись фільтром типу ULPA задля максимального зменшення контамінуючих частинок, які можуть потрапити під час виробництва стерильних ін'єкційних препаратів на основі багреміцинів.

9.2.2. Підготовка персоналу

Вимоги до персоналу фармацевтичного підприємства можуть бути різноманітні і залежать від конкретної посади. Однак загальні вимоги можуть включати [181]:

1. Освіта і кваліфікація. Зазвичай для роботи на фармацевтичному підприємстві потрібна вища фармацевтична освіта або споріднена галузь. Деякі посади можуть вимагати додаткової спеціалізованої кваліфікації.
2. Досвід роботи. Залежно від конкретної посади може вимагатися певний рівень досвіду в галузі фармації або виробництва медичних препаратів.

3. Знання регуляторних норм. Працівники фармацевтичних підприємств повинні бути орієнтовані на дотримання регуляторних вимог і стандартів, пов'язаних з виробництвом лікарських засобів. До цього входить ціла низка документів [181]:

- GMP (Добра практика виробництва): Це міжнародний стандарт, який встановлює вимоги до якості виробництва лікарських засобів. Робітники повинні розуміти та дотримуватися цих стандартів.

- Документація з валідації: Валідація — це процес підтвердження, що системи та процеси виробництва працюють належним чином. Ця документація може включати протоколи валідації та інші відповідні документи.

- Специфікації продукту: Детальний опис властивостей і вимог до лікарського засобу або сировини.

- Технічна документація виробництва: Включає в себе процеси виготовлення, вимоги до обладнання, рецептури, процедури очищення та іншу інформацію.

- Нормативно-технічна документація з контролю якості: Включає методи контролю якості продукції, стандарти тестування, вимоги до обладнання лабораторії.

- Документація з безпеки: Включає в себе інструкції з безпеки для працівників, матеріальні безпекові дані (MSDS) для хімічних речовин та ін.

- Фармакопея: Спеціальні книги, які містять стандарти для лікарських препаратів та їх складових. Наприклад, Європейська фармакопея, Фармакопея США.

- Норми забезпечення якості продукції: Це може включати ISO 9001 та інші стандарти якості.

4. Комунікаційні навички. Важливо мати здатність ефективно спілкуватися, особливо в умовах співпраці з іншими фахівцями,

включаючи лабораторних працівників, маркетологів, фармацевтів та інші групи.

5. Відповідальність і уважність. У фармацевтичній галузі дотримання точних стандартів і уважність до деталей є вельми важливими.
6. Здатність працювати в команді. Багато завдань у фармацевтиці вимагають співпраці з іншими фахівцями та вміння працювати в команді.
7. Аналітичні навички. Здатність аналізувати дані, виявляти проблеми та розробляти ефективні рішення є ключовою для багатьох робочих позицій.
8. Дотримання етичних норм. Працівники у фармацевтиці повинні дотримуватися високих етичних стандартів, оскільки їхні рішення можуть впливати на здоров'я та безпеку пацієнтів.

Інструктаж для робітника фармацевтичного підприємства є важливим етапом введення працівника в робочий процес та забезпечення йому необхідних знань та навичок. Основні етапи інструктажу можуть виглядати наступним чином [181]:

Ознайомлення з умовами праці:

- Представлення до колективу та знайомство з колегами.
- Огляд робочого місця, обладнання та інших робочих умов.

Безпека та охорона здоров'я:

- Ознайомлення з правилами безпеки на роботі.
- Використання засобів індивідуального захисту (ЗІЗ).
- Дії у випадку аварії чи надзвичайної ситуації.

Вимоги до якості:

- Ознайомлення з принципами Доброї Виробничої Практики (GMP) та іншими стандартами якості.
- Ознайомлення з процедурами та документацією:

- Вивчення процедур виробництва, контролю якості, зберігання та ін.
- Розбір документації, яку працівник буде використовувати на робочому місці.

Технічні навички:

- Навчання використанню та обслуговуванню спеціального обладнання.
- Викладення процесів роботи та контролю параметрів виробництва.

Системи якості та аудити:

- Ознайомлення з системами якості, що діють на підприємстві.
- Знайомство з процедурами внутрішніх аудитів.

Етика та професійна поведінка:

- Вивчення корпоративних правил та внутрішніх стандартів підприємства.
- Спілкування та взаємодія з колегами та клієнтами.

Завдання та відповідальності:

- Уточнення ролі працівника на підприємстві.
- Розкриття завдань та відповідальностей.

Навчання фармацевтичного персоналу – це комплексний процес, який включає в себе ряд етапів та видів навчальних заходів. Для цього використовують теоретичне навчання, шляхом впровадження лекторіїв, семінарів та інтерактивних тренінгів. Практичне навчання включає в себе майстер-класи та навчання на робочому місці. Також, нерідко відділ управління персоналом залучає персонал до підвищення кваліфікації шляхом відвідування додаткових спеціалізованих курсів. Сюди ж додається стажування на інших виробничих потужностях. Також, важливим атрибутом якості підготовки персоналу є його оцінка, шляхом введення контролю знань та залікових випробувань [181].

9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Дезінфікуючі засоби грають надзвичайно важливу роль в фармацевтичному виробництві, забезпечуючи найвищий ступінь безпеки, якість і чистоти лікарських засобів. Основні аспекти важливості дезінфікуючих засобів в фармацевтиці можна визначити так [181]:

1. Дезінфікуючі засоби використовуються для забезпечення стерильності та гігієнічності у всіх фазах виробництва, включаючи лабораторії, зони виробництва та зони зберігання.
2. Дезінфікуючі засоби інактивують та знищують бактерії, віруси, гриби та інші патогени, що можуть призвести до забруднення лікарських препаратів.
3. Регулярна дезінфекція обладнання дозволяє уникнути забруднення продукції патогенами та іншими шкідливими мікроорганізмами.
4. Використання дезінфікуючих засобів допомагає відповідати вимогам GMP та інших стандартів якості виробництва лікарських засобів.
5. Зменшення ризику забруднення допомагає забезпечити стабільність та якість лікарських препаратів впродовж їхнього терміну придатності.
6. Використання дезінфікуючих засобів підвищує безпеку працівників, запобігаючи можливості зараження та поширення інфекційних захворювань.
7. Регулярне дезінфікування допомагає зберігати ефективність та тривалість служби виробничого обладнання.

Використання дезінфікуючих засобів в фармацевтичному виробництві є ключовим елементом системи контролю якості та безпеки. Це дозволяє забезпечити високий стандарт якості лікарських засобів, що надається пацієнтам, та допомагає утримувати високу репутацію фармацевтичних підприємств [181].

Класифікація дезінфекторів за діючою речовиною включає різні групи засобів залежно від їхніх активних компонентів. Ось деякі основні групи дезінфекторів та їхні переваги та недоліки [182]:

Альдегідні дезінфектори:

Приклад діючої речовини: Глутаровий альдегід, Формалін.

Переваги: Висока ефективність проти багатьох мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси і грибки. Застосовуються в медичних установах та лабораторіях.

Недоліки: Мають специфічний запах, можуть викликати подразнення, вимагають вентиляції приміщення.

Пероксидоводневі дезінфектори:

Приклад діючої речовини: Пероксид водню.

Переваги: Ефективність проти бактерій, вірусів і грибків. Малотоксичні, відсутність специфічного запаху.

Недоліки: Нестабільність в світлі, потребують зберігання у темному контейнері.

Кватерні аміни:

Приклад діючої речовини: Амонієві сполуки (наприклад, бензалконій хлорид).

Переваги: Малотоксичні, ефективні проти багатьох мікроорганізмів. Застосовуються для поверхневої дезінфекції.

Недоліки: Можуть бути менш ефективними проти вірусів, потребують взаємодії з органічними забрудненнями.

Органічні дезінфектори:

Приклад діючої речовини: Срібло азотнокисле (наприклад, в Аргенвіт).

Переваги: Антибактеріальні властивості, безпечність для навколишнього середовища, можуть використовуватися для дезінфекції поверхонь та навіть для локального застосування.

Недоліки: Дорогі, можуть залишати сліди срібла на оброблених поверхнях.

Гуанідинові дезінфектори:

Приклад діючої речовини: Гуанідин та його похідні.

Переваги: Бактерицидна та віруліцидна дія, стійкі захисні плівки після обробки.

Недоліки: Можуть мати обмежений спектр дії.

Комбіновані дезінфектори:

Приклад діючої речовини: Кілька активних компонентів з різних груп.

Переваги: Широкий спектр впливу на бактерії та мікроби.

Недоліки: Можуть бути складнішими за використанням та мати вищі витрати.

Кожна група дезінфекторів має свої переваги та недоліки, і вибір конкретного засобу залежить від вимог до дезінфекції, умов застосування та специфікацій конкретного середовища. З врахуванням роботи запропонованого підприємства, варто обрати 3 деззасоби з різною діючою речовиною. Через це, маємо щонайменше відмовитись від комбінованих препаратів, через те, що так чи інакше вони будуть співпадати з одним з препаратів, а пошук на такий склад, який би не співпадав буде по часу доволі затратним. Пропонується розглянути групу альдегідних, гуанідинових та амонієвих (чотирьохамінні сполуки, ЧАС) препаратів. Порівняння за економічною доцільністю представлено в табл.9.1.

Таблиця 9.1.

Порівняння різних деззасобів для фармацевтичного виробництва ін'єкційних препаратів на основі багреміцинів

Тип препарату	Назва деззасобу	Об'єми випуску деззасобу, л	Вартість за 1 л, грн	Робочий розчин, %	Ціна за 1 л робочого розчину, грн	Джерело
Альдегідні	Antiseptica Combi Surface	1; 2,5; 5;	400	0,1	0,04	[183]
	Деканаль	0,03; 1;	600	0,1	0,06	[184]
	Віроцид	0,15; 1; 5; 10; 20; 210;	410	0,25	0,1025	[185]
Гуанідинові	Тентамін-Плюс	1	655	0,01	0,0066	[186]
	Унидиз ультра	1; 5;	390	0,1	0,039	[187]
	Неодез Екстра	1; 5; 20;	200	1	0,2	[188]
ЧАС	Вернедор-Преміум	1; 5;	556	0,05	0,0278	[189]
	Максисан	1;	1062	0,04	0,0425	[190]

	Дезекон	1; 5; 20;	360	0,2	0,072	[191]
--	---------	-----------	-----	-----	-------	-------

При виборі дезінфекційного засобу варто звернути увагу на об'єм, який пропонується, оскільки виробництво потребує чималої кількості препарату. Щодо альдегідних препаратів, найдешевшим виявився Antiseptica Combi Surface, а по об'ємному еквіваленту широку лінійку випуску має Віроцид. При цьому, вартість робочого розчину останнього препарату майже в 2,5 рази більша за Antiseptica Combi Surface. Оскільки Antiseptica Combi Surface випускається й в 5 л каністрах, пропонується обрати його як основний дезінфекційний засіб альдегідного типу.

Найдешевшим препаратом гуанідинового типу виявився Тентамін-Плюс, але він не має випуску у великих об'ємах, що не дозволяє обрати саме цей препарат, через те, що він буде швидко закінчуватись і утворювати велику кількість пластикової тари, яку потрібно буде збирати та здавати на утилізацію, а отже, потребуватиме велику кількість місця на складі для тривалого зберігання. Тому, пропонується обрати саме Унідез ультра, який є наступним по вартості робочого розчину, а також випускається в каністрах по 5 л.

Препарати на основі ЧАС доволі дешеві, порівняно з альдегідними та гуанідиновими препаратами. Найдешевшим по вартості робочого розчину виявився Вернедор-Преміум. Оскільки цей препарат випускається ще й в 5 л каністрах, пропонується залишити вибір саме на цьому препараті.

Отже, для запропонованого фармацевтичного виробництва обираємо Antiseptica Combi Surface, Унідез ультра та Вернедор-Преміум.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Як зазначалось, для виробництва ампул буде використовуватись технологія BFS. Проте, для виробництва самих ампул використовуються пластикові трубки, а нами було порівняно лише різні типи пластикових гранул. Тому, як підготовку первинної упаковки потрібно передбачити саме екструзійну машину, яка утворює з пластикових гранул готові трубки.

З цією метою можна використовувати екструдер SONGHU, який виробляє мікротруби заданого розміру (для запропонованого виробництво достатньо трубок по 0,5 см в діаметрі), шляхом розплавлення та формування полімерних гранул (в нашому випадку – Toras. До автоматичної лінії пропонується до 12 різних видів матриць для одержання трубочок. Обладнання виконано з сталі нержавіючої типу SUS316. Точність вимірювання діаметра досягає до 0,1 мм. Автоматична лінія складається з автоматичного загрузувача гранул, одношнекового екструдера, пресс-форми, вакуум-охолоджувального баку, холодильнику, лазерного діаметровимірювача, тягового різача та автоматичної системи різки та збирання [192].



Рис.9.3. Автоматична екструзійна лінія SONGHU [192]

Оскільки ми використовуємо технологію BFS додаткових умов для підготовки первинної упаковки немає, оскільки в одному апараті відбувається формування за допомогою стерильного повітря, наповнення та запайка ампул в стерильних умовах.

9.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Оскільки препарат має ін'єкційну форму, маємо підготувати воду для ін'єкцій. На фармакологічних підприємствах виробляють воду для ін'єкцій переважно як "*in bulk*", тобто не у вигляді готового лікарського засобу. Процес отримання води для ін'єкцій зазвичай здійснюється з води питної або води очищеної згідно з вимогами Державної Фармакопеї України (ДФУ) [193].

Вода для ін'єкцій, яка використовується для виробництва парентеральних лікарських засобів, що потім піддаються термічній стерилізації, повинна відповідати стандартам, викладеним у монографії ДФУ [193].

Для отримання води для ін'єкцій часто застосовують багатоступінчасті схеми, які вибираються залежно від аналізу вихідної води та наявного обладнання. Отримана вода для ін'єкцій повинна відповідати чинним нормативним вимогам та стандартам [193].

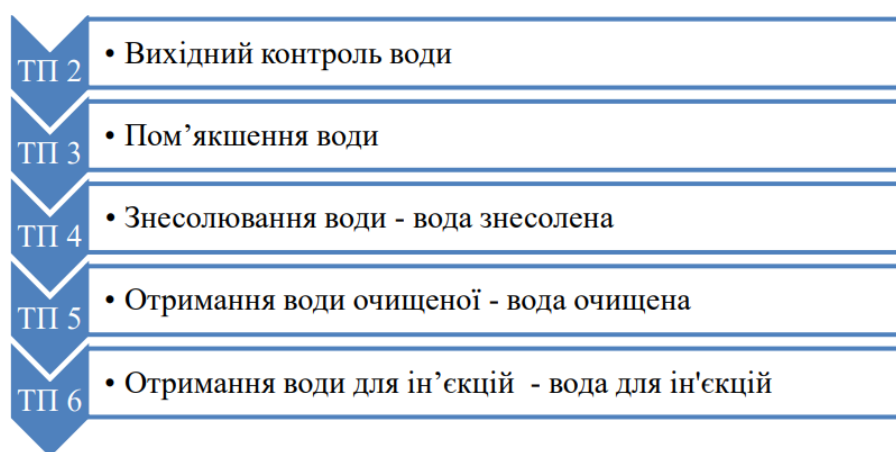


Рис.9.4. Узагальнена технологічна схема очистки води [193]

Для виробництва фармакопейної води використовують воду питну або попередньо очищену, зазвичай за допомогою різних методів підготовки. Перший етап виробництва включає вихідний контроль якості питної води [193].

На основі результатів цього контролю вибирається метод подальшої підготовки води, тобто обирається технологічна схема. Один із ключових показників, що контролюється на першому етапі, - це твердість (жорсткість), яка викликає утворення накипу під час дистиляції. Важливо відзначити, що всі апарати, використовувані на наступних стадіях виробництва, ставлять високі вимоги до жорсткості води. Жорсткою вважається вода, яка містить значну кількість солей кальцію і магнію, і її жорсткість виражається у міліграмах-еквівалентах (мг-екв) кальцію і магнію на 1 літр води [193].

На другому етапі виробництва відбувається пом'якшення води, призначене для розчинення гідрокарбонатів кальцію і магнію. Під час нагрівання ці

гідрокарбонати розпадаються на вуглекислоту та нерозчинні карбонати Ca і Mg. Формування накипу включає у себе участь мінеральних солей, розчинених органічних речовин, силікатів, механічних домішок, кремнеземів, глинозему, гідрокарбонатів заліза та інших речовин, які обов'язково видаляють перед перегонкою - процес, який називається пом'якшенням води [193].

Пом'якшення води може здійснюватися двома основними способами: осадженням і іонним обміном [193].

Осадження - це процес видалення іонів кальцію і магнію з води шляхом перетворення їх у малорозчинні з'єднання за допомогою додавання необхідних кількостей розчинів, таких як $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH , Na_2CO_3 кристалічного тощо. Після взаємодії з цими речовинами в утвореному накипі утворюються осади, які вилучаються відстоюванням або фільтруванням, часто використовуючи пісочні фільтри [193].

Іонний обмін - це процес обміну між катіонами кальцію і магнію та катіонами натрію або водню, що містяться в практично нерозчинному матеріалі, який називається катіонітом [193].

З врахуванням дешевезни першого методу пропонується обрати саме осадження, яке не потребує додаткових колонок та носіїв, які потрібно регенерувати [193].

Третій етап - це знесолювання (демінералізація) води, спрямоване на видалення небажаних катіонів і аніонів. Цей етап продовжує роботу з очищення води від мінеральних забруднень після пом'якшення води. До основних методів знесолення води відносять: дистиляцію, іонний обмін, електродіаліз та зворотній осмос. Знесолення води пропонується проводити через зворотній осмос, оскільки класична технологія дистиляції буде довготривалою [193].

Четвертий етап - отримання очищеної води, може бути виконаний за допомогою трьох різних схем [193]:

1. **Схема перша** представляє з себе дистиляцію. Ця схема вимагає значних фінансових витрат, зокрема на енергопостачання, і може бути ефективною

при наявності вільного дистилятора та достатньої кількості промислової пари.

2. **Схема друга** включає фільтрацію через вугільний фільтр, деіонізацію, грубу фільтрацію та пом'якшення. Ця схема вимагає менших капіталовкладень і енергопостачання, але може стикатися з труднощами експлуатації, зокрема, пов'язаними з регенерацією іонообмінників кислотами та лугами.
3. **Схема третя** представляє з себе зворотний осмос. Ця схема є найбільш оптимальною, оскільки має невеликі експлуатаційні витрати, не вимагає великих капіталовкладень і частої регенерації обладнання.

Отже, для четвертого етапу обираємо зворотній осмос.

П'ятий та останній етап виробництва води для ін'єкцій включає три основні схеми [193]:

Схема 1 визначається виключно дистиляцією. Ця схема вважається найкращою, оскільки дистиляція рекомендована міжнародними організаціями, які виробляють лікарські засоби.

Схема 2 включає в себе процес зворотного осмосу. Ця схема може комбінувати перший етап дистиляції з другим етапом зворотного осмосу для отримання очищеної води з водогінної води. Проте вона вимагає значних капіталовкладень, існує довгий час обробки води та високі вимоги до мембран, що може вести до значних втрат води.

Схема 3 представляє собою комплекс процесів, включаючи дистиляцію та фільтрацію через фільтр з діаметром отворів 0,22 мкм.

Враховуючи те, що вода для ін'єкцій не має містити мікроорганізмів, обираємо схему 3 (використання дистилятора та мікрофільтрації) для фінальної очистки та одержання води для ін'єкцій. Тоді, кінцева схема одержання води для ін'єкцій буде наступною:

- Пом'якшення води шляхом додавання натрій карбонату (кальцинована сода), кальцій гідроксиду (вапняна вода), натрій ортофосфату [194] та осіданням з подальшим фільтруванням через піщаний фільтр.
- Знесолення води за допомогою зворотнього осмосу.
- Одержання води очищеної також шляхом зворотнього осмосу
- Одержання води для ін'єкцій шляхом дистиляції та мікрофільтрації крізь фільтр в 0,22 мкм.

9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Отже, до додаткових стадій буде відноситись підготовка вентиляційного повітря, води знесоленої та мікротрубок для одержання ампул. Далі відбуватиметься технологічний процес, який буде починатись зі створення самого рідкого препарату. Раніше згадувалось, що багреміцини не можуть розчинятися у звичайній воді. Було вирішено, що в препараті додатково буде застосовуватись етиловий спирт. Тому, логічно спочатку змішати багреміцини з етиловим спиртом, а після цього, змішати спиртову суміш з водою для ін'єкцій. Для цих операцій можна використати один збірник, поступово виконуючи вищезазначені операції. За одну серію виготовляється 1,86 л препарату, отже, треба передбачити реактор-змішувач об'ємом 5 л.

Для одержання лікарського засобу можна використати китайський сталевий реактор XHSG-5L. Реактор виконано з нержавіючої сталі 316. Має перемішувач, який має швидкість обертів від 30 до 500 об/хв. Оснащений подвійною сорочкою та може стерилізуватись [195].



Рис.9.5. Реактор-змішувач XHSG-5L [195]

Після одержання рідкого лікарського засобу треба передбачити саму лінію BFS. Для потреб запропонованого виробництва достатньо використати BFS автомат AFP1, який може виготовляти ампули від 0,4 до 20 мл (за потребами виробництва у нашому випадку – 5 мл). Виробнича потужність апарату – до 1800 ампул на годину. Формування ампул, їх наповнення та запаювання відбувається в стерильних умовах, а тому препарат залишатиметься стерильним. Апарат додатково можна під'єднувати до СІР мийки [196].



Рис.9.6. Автоматична лінія BFS AFP1 [196]

Після того, як ампули наповняться та запаюються, їх потрібно перевірити на протікання та герметичність. З цією метою використовують інспекційні машини. Для запропонованого виробництва можна використати інспекційну машину SED-400DJL-C. Вона може аналізувати ампули об'ємом від 1 до 20 мл.

Продуктивність 100 ампул/хв. Для перевірки використовується компресійне повітря [197].



Рис.9.7. Інспекційна машина для ампул SED-400DJL-C [197]

Одержані та якісні ампули після інспекційної машини мають бути проетиковані та вкладені в коробку з інструкцією. Оскільки ампули пластикові, а також з'єднані один між одним (по 5 штук), вкладання додаткового вкладиш-тримача недоцільне. Вже існують автоматичні лінії, які маркують та фасують пластикові з'єднані ампули. Гарним варіантом для запропонованого виробництва є машина картонер-етикувальник серії Р 91. Вона маркує та фасує до 90 ампул/хв [198].

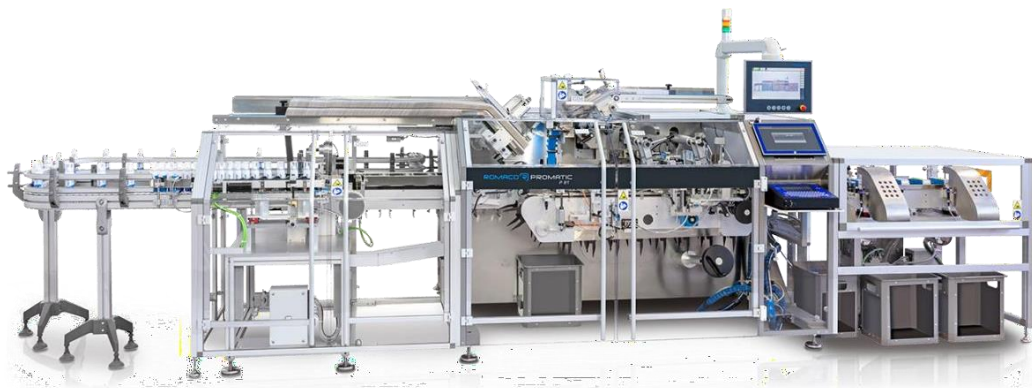


Рис.9.8. Картонер-етикувальник серії Р 91 [198]

Після фасування коробки з ампулами перекладають вручну в групову тару у вигляді картонної коробки. На цій коробці вказують номер партії та дату виготовлення. Передають на склад на зберігання.

РОЗДІЛ 10

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИРОБНИЦТВА ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАГРЕМІЦИНІВ

Специфікація обладнання, яке використовується для виробництва лікарського засобу на основі багреміцинів з метою лікування бактеріємії показано в табл.10.1.

Таблиця 10.1.

Специфікація обладнання фармацевтичного виробництва лікарського засобу на основі багреміцинів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник висотою 10 м. Виконано зі сталі нержавіючої DN 80 - DN 150, та має алюмінієву сітку DN 80 - DN 125. Країна: Чехія. Торгова марка: MANDÍK, a.s. ¹
Ф – 2 Ф-8	Фільтр грубої очистки повітря	2	Фільтр грубої очистки. Клас чистоти G4. Розмір (мм): 493×493×23. Робоча температура до 100 °С. Відфільтровує частинки до 10 мікрон. Ефективність фільтрування 60 %. Країна: Китай. Торгова марка: Dongguan Walson Environmental Purifying Technology Co., Ltd. ²
К-3 К-7	Компресор	2	Компресор АВАС В7000/500 FT10 BELTAIR. Продуктивність до 1210 л/хв. Максимальний робочий тиск 11 бар. Об'єм ресивера 500 л. Країна: Італія. Торгова марка: АВАС ³
Т-4	Теплообмінник	1	Промисловий теплообмінник PARAFLOW. Пластини виконані з нержавіючої сталі 304, 316; Titanium Grade 1. Максимальний робочий тиск 8 бар. Робоча температура Від -35 °С +200 °С. Країна: Україна. Торгова марка: Tapflo ⁴
Ф-5	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр тонкої очистки. Клас очистки – F7. Ефективність фільтрування 95 %. Розмір (мм): 217x208x25. Країна: Німеччина. Торгова марка: Salda ⁵

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ док.ум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Вергун Ю.В.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.					122	138
Реценз.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					РОЗДІЛ 10 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИРОБНИЦТВА ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАГРЕМІЦИНІВ		

Продовження табл.10.1.

Ф-6	Фільтр надочищення	1	Фільтр ULPA. Клас чистоти U17. Ефективність очистки 99,999995%. Матеріал фільтрування – мікроскловолокно. Розмір (мм): 305x305x78. Країна: Україна. Торгова марка: Фолтер ⁶
Д-9 Д-25	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Об'ємно-ваговий дозатор SK52QMF111B(HD). Швидкість розливу – 180 л/хв. Робоча температура -25°C - +55°C. Країна: Китай. Торгова марка: Beijing Sanki Petroleum Technology Co., Ltd. ⁷
3-10 3-14 3-17 3-20 3-23	Збірник для пом'якшення води	5	Реактор-змішувач XHSG-10L. Робочий об'єм – 8 л. Виготовлено зі сталі нержавіючої SUS316. Має мішалку та оснащений подвійною сорочкою. Швидкість мішалки – 30-500 об/хв. Країна: Китай. Торгова марка: Xiaohan (Guangzhou) Trading Co., Ltd ⁸
Н-11 Н-15 Н-18 Н-21 Н-27	Насос перистальтичний	5	Перистальтичний насос HELIOS AS 10 IX-47. Продуктивність – 47 л/год. Потужність двигуна – 0,18 кВт. Робочий тиск – 0,25 МПа. Країна: Італія. Торгова марка: FLUIMAC ⁹
Ф-12	Фільтр піщаний	1	Фільтр піщаний ATS ÇKTFLT500. Підключення бокове. Матеріал корпусу – поліпропілен. Продуктивність – 0,403 м ³ /год. Країна: Україна. Торгова марка: Atlaspool ¹⁰
3-13 3-16	Установка зворотнього осмосу	2	Установка зворотнього осмосу OSFIL-250. Продуктивність – 150 л/год. Ступінь видалення солей з очищеної води - до 99,9%. Країна: Україна. Торгова марка: Ebara ¹¹
Д-19	Дистиляційна установка	1	Дистилятор CopperGarden® T-1679. Об'єм – 10 л. Корпус виконано з міді. Країна: Німеччина. Торгова марка: Distillatio ¹²
М-22	Мікрофільтраційна установка	1	Мікрофільтраційна установка CMP-01, оснащена керамічними фільтрами. Виготовлено зі сталі нержавіючої AISI 304. Робочий тиск – 4 бар. Продуктивність – 50-100 л/год. Країна: Китай. Торгова марка: BTS Engineering ¹³
Е-24	Екструдер для пластикових труб	1	Екструдерна лінія SONGHU. Оснащений 12 матрицями для виробництва трубок. Виготовлений зі сталі нержавіючої SUS316. Точність розміру – 0,1 мм. Продуктивність – 50 труб/год. Країна: Китай. Торгова марка: SONGHU ¹⁴

Закінчення табл.10.1.

З-26	Збірник для приготування лікарського засобу	1	Реактор-змішувач XHSG-5L. Робочий об'єм – 3 л. Виготовлено зі сталі нержавіючої SUS316. Має мішалку та оснащений подвійною сорочкою. Швидкість мішалки – 30-500 об/хв. Країна: Китай. Торгова марка: Xiaohan (Guangzhou) Trading Co., Ltd ¹⁵
БФС-28	Автоматична установка BFS	1	Автоматична лінія по формуванню, наповнюванню та запаюванню AFP1. Продуктивність – до 1800 ампул/год. Має підключення до СІР мийки. Країна: Китай. Торгова марка: Shanghai Pharmaceutical Machinery Co., Ltd. ¹⁶
І-29	Інспекційна машина для пластикових ампул	1	Інспекційна машина для ампул SED-400DJL-C. Продуктивність – 100 ампул/хв. Тиск повітря – 0,6 МПа. Розмір (мм): 1864.5*3962*2100. Країна: Китай. Торгова марка: SED Pharma ¹⁷
ЕФ-30	Етикувально-фасувальна лінія для пластикових ампул	1	Етикувально-фасувальна лінія Р 91. Продуктивність – 90 ампул/хв. Виготовлено зі сталі нержавіючої SUS316. Країна: Германія. Торгова марка: Romaco ¹⁸

Примітка: 1 - <https://mandik.cz/product-line/industrial-heating/exhaust-and-air-intake-systems>, 2 - <http://airfiltrationen.com/1-1-1-4-g4-coarse-air-filter.html>, 3 - <https://storgom.ua/ua/product/kompressor-ceccato-b7000-500-ft10-beltair.html>, 4 - <https://tapflo.ua/products/teploobmenniki#spetsialne-vykonannya>, 5 - <https://cleanfilter.lt/en/ris-150-pe-eko-f7-g4-filter-set-efficient>, 6 - <https://folter.com.ua/pdf/pritVozduh/fyas-s.pdf>, 7 - <https://sankichina.en.made-in-china.com/product/GSHmciJJrUK/China-Hi-Flow-Fuel-Dispenser-Fuel-Pump-with-100-120-L-Min-Flow-Rate.html>, 8 - <https://mosende.en.made-in-china.com/product/vwQAMmfGqhWa/China-10L-Stainless-Steel-Jacket-Pharmaceutical-Equipment-Chemical-Reactor.html>, 9 - https://bts.net.ua/pumping-equipment-distillery/chemical-pumps/peristaltichniy-nasos-helios-as-10-ix-47-z-zm-nnoyu-produktivn-styu-/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA7t6sBhAiEiwAsaieYgZYQcQv6BF1smB3DTyWGLVOC90Cd42aJJW9nnf-pwmbe2Qiw_3tfjBoC124QAvD_BwE, 10 - <https://ge-ua.net/product/filtr-pishhanij-komertsijnogo-tipu-norm-model/>, 11 - https://osmosfilter.com.ua/ua/p1175807273-obratnyj-osmos-fil.html?gclid=CjwKCAiA7t6sBhAiEiwAsaieYsnizckBpRdPdThKggt4viaZJvW9bQHkYY-of1d7u99d3O8nIe1zdBoChzwQAvD_BwE, 12 - https://www.destillatio.eu/en/distillation-stills/coppergarden-10-l-whiskey-distillation-apparatus_11213_3291, 13 - <https://bts.net.ua/ua/membrane-filter/membrane-pilot-plants/cmp-01-m-krof-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-keram-chnimi-membranami/>, 14 - <https://ru.songhu3dprint.com/product/high-precision-medical-catheter-tubing-extrusion-machine.html>, 15 - <https://mosende.en.made-in-china.com/productimage/BwVfeTKrAicI-2f1j00HsPizDdMfLkB/China-5-Liter-Stainless-Steel-Bio-Biological-Reactor-with-Agitator.html>, 16 - <https://lucybian.en.made-in-china.com/product/BSLJEVaKnskv/China-Bfs-Blow-Fill-Seal-Machine-Plastic-Ampoule-Blowing-Filling-and-Sealing-Machine.html>, 17 - <https://sedpharma.com/product/ampoule-inspection-machine-sed-djil/>, 18 - <https://www.romaco.com/products/product-details/p-91-series>

РОЗДІЛ 11

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ БАКТЕРІЄМІЇ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Повітря збирається за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) на висоті 10 метрів, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів досягає найнижчого рівня.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Атмосферне повітря, зібране за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1), проходить фільтр грубого очищення (Ф-2) і піддається очищенню на рівні 60%.

ДР 1.3. Компресування повітря

Атмосферне повітря пройде стиснення в компресорі (К-3) до тиску приблизно 0,9 МПа. Внаслідок цього процесу температура підвищується більше за кімнатну, що вимагає подальшого охолодження.

ДР 1.4. Контроль температури повітря

Повітря подається до теплообмінника (Т-4), де датчик температури фіксує значення 22 °С. Після цього система теплообмінника автоматично регулює теплові агенти для забезпечення контролю температури на встановленому рівні.

ДР 1.5. Тонке очищення повітря

Атмосферне повітря пройшовши через фільтр (Ф-5) класу очистки F7, досягає ступеня очищення на рівні 95%.

ДР 1.6. Надочищення повітря

Після проходження через фільтр класу очистки F7 (Ф-5), очищене повітря подається через ULPA фільтр (Ф-6), що забезпечує ступінь очищення до 99,999995%. Повітря подається до виробничих приміщень.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ</i>			134			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>							
<i>Розроб.</i>		<i>Вергун Ю.В.</i>			<i>РОЗДІЛ 11 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>			<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Перевір.</i>		<i>Буценко Л.М.</i>								125	138
<i>Реценз.</i>											
<i>Н. Контр.</i>											
								<i>Кафедра БТМ</i>			

ДР 1.7. Рециркуляція використаного повітря

За допомогою компресору (К-7) відпрацьоване повітря вилучається з робочої зони та подається до фільтру грубої очистки (Ф-8). Після цього, повітря проходить новий цикл очистки, подаючись до теплообміннику (Т-4).

ДР 2. Підготовка води для ін'єкцій

ДР 2.1. Пом'якшення води водопровідної

До збірнику (З-10) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-9) наливають 5 л водопровідної води. На технічних вагах зважують 15 г натрію карбонату, 0,81 г кальцій гідроксиду та 0,1 г натрій ортофосфату. Вмикається мішалка, та весь вміст активно перемішується протягом 10 хв. Після цього, воду залишають протягом 30 хвилин для осадження небажаних домішок.

ДР 2.2. Видалення домішок та знесолення води водопровідної

Після проходження 30 хвилин, в збірнику (З-10) знову вмикають мішалку, на 5 хвилин, для того, щоб підняти весь осад, що вже встиг осісти. Після цього, за допомогою перистальтичного насосу (Н-11) вода з осадом проходить піщаний фільтр (Ф-12), де залишається більша частина осаду, після чого напругу подається в установку зворотнього осмосу (З-13) для додаткового знесолення. Вода проходить крізь фільтри, тим самим очищуючись від солей. Тривалість очистки – 30 хвилин. Одержана знесолена вода подається на тимчасове зберігання до збірнику (З-14).

ДР 2.3. Одержання води очищеної

За допомогою перистальтичного насосу (Н-15) вода подається до установки зворотнього осмосу (З-16). На даній стадії фільтри утримують домішки, які могли залишитися після попередніх стадій очистки. Тривалість очищення становить 30 хв. Одержана знесолена вода подається на тимчасове зберігання до збірнику (З-17).

ДР 2.4. Одержання води для ін'єкцій

За допомогою перистальтичного насосу (Н-18) вода очищена передається до дистиляційної установки (Д-19). Встановлюється температура в 100 °С. Тривалість дистиляції становить 2 години. Одержана вода потрапляє безпосередньо до збірника (З-20). Після дистиляції, вода, за допомогою перистальтичного насосу (Н-21) подається до мікрофільтраційної установки (М-22) для знешкодження агентів, що могли ще залишитись у воді. Діаметр отворів керамічних фільтрів становить 0,22 мкм. Тривалість фільтрації – 10 хвилин. Після цього, вода для ін'єкцій подається до попередньо простерилізованого збірника (З-23) на зберігання.

ДР 3. Виготовлення мікротруб як основи для ампул

До бункера екструдера (Е-24) завантажуються гранули полімера Торас в кількості 1 кілограм, попередньо зваженого на технічних вагах. Встановлюється температура плавлення гранул – 150 °С. Формуються трубочки діаметром 0,5 см. Тривалість виробництва - 1 година.

ТП 4. Приготування лікарського засобу

В асептичних умовах в стерильному циліндрі об'ємом 250 мл відміряють 173 мл етилового спирту 96-%. Спирт в умовах класу чистоти А переносять в попередньо простерилізований збірник (З-26). Після цього, обережно, попередньо проконтролювавши вагу, вносять 67 г багреміцинів. Вмикається мішалка, та перемішує спиртову суміш до повного розчинення. Після цього, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-25) до здірнику доливають 1,62 л води для ін'єкцій. Знову вмикається мішалка до повної гомогенізації рідкої фази. За допомогою перистальтичного насосу (Н-27) готовий лікарський засіб подається до автоматичної лінії BFS (БФС-28).

ТП 5. Формування, наповнення та запаювання ампул з лікарським засобом на основі багреміцинів

До бункеру БФС-28 подаються мікротрубочки від ДР 3, а також підводиться готовий лікарський засіб від ТП 4. Виробництво ампул починається з визначення геометричної довжини самої ампули, по якій вбудована прес-форма

(одразу на 5 ампул) відрізає та запаює дно майбутнього контейнера. Процес продовжується, коли майбутній флакон опускається в прес-форму через відкритий отвір форсунки. Використовуючи видування стерильного повітря (від ДР 1.6), формується ампула. Після завершення формування ампули, стерильне повітря видаляється, а готовий лікарський засіб (від ТП 4) подається через форсунку розливу згідно.

Після наповнення ампул, відповідна прес-форма формує його головку, що одночасно запаює лікарський засіб. Цей етап є завершальним на даній стадії виробництва. Тривалість усього процесу становить 15 хвилин. Наприкінці отримують 372 ампули. Готові ампули передаються на перевірку герметичності та наявності сторонніх включень.

ТП 6. Інспекція ампул на невідповідність якості готового лікарського препарату

На цьому етапі виготовлені ампули піддаються інспекції в інспекційній машині (І-29) для контролю герметичності та виявлення сторонніх включень. У випадку виявлення браку чи неліквідних ампул, вони направляються на утилізацію. Ампули, які успішно пройшли перевірку, передаються на наступний етап для етикування та фасування.

ПМФ 7. Етикування та фасування пластикових ампул по коробкам

Етикувальна-фасувальна машина (ЕФ-30) наклеює інформаційну стрічку на 5 з'єднаних між собою ампул. На етикетці вказано назву препарату, кількість діючої речовини, об'єм, серію, дату виготовлення та дату закінчення строку придатності. Після цього, ампули (з'єднані між собою по 5 штук) вкладаються в готові картонні коробки, як вторинна упаковка, разом з інструкцією по використанню препарату. Кількість коробок має становити 74 штуки. Далі, вони передаються на групове пакування.

ПМФ 8. Групова упаковка готового лікарського препарату

Всі одержані коробки з лікарським засобом від ПМФ 7 вручну складаються до картонної групової коробки. На цю коробку наносять інформацію

щодо номеру партії препарату, а також дату його виготовлення. Після всіх цих маніпуляцій, коробку передають на склад та зберігають при температурі нижче 25 °С.

РОЗДІЛ 12

ОПИС ІН'ЄКЦІЙНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАГРЕМІЦИНІВ ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на медичний препарат Багреміцин, який являє собою готовий ін'єкційний розчин, який містить багреміцини як діючу речовину.

Склад:

Діючі речовини:

5 мл розчину містить 0,18 г багреміцинів

Допоміжні речовини:

Спирт етиловий

Вода для ін'єкцій

Призначення. Бактеріємія, викликана *B. subtilis* та MRSA

Форма випуску. Ампули по 5 мл №5

Таблиця 12.1

Специфікація на ін'єкційний препарат «Багреміцин»

Найменування показників контролю	Встановлені значення	Методи контролю
1	2	3
Опис	Прозорий розчин червоного кольору	За п. 1 АНД, візуально
Ідентифікація	Утворення стійкого червоного осаду	За п. 2 АНД
Прозорість	Прозора	За п. 3 АНД, ДФУ 2.2.1, вид. 1
Кольоровість	Червоне забарвлення	За п. 4 АНД, ДФУ 2.2.2, вид. 1
pH	5,0-5,5	За п. 5 АНД, ДФУ

		2.2.3, вид. 1
Супровідні домішки	На хроматограмі випробовуваного розчину площа будь-якого піка не має перевищувати площу піка багреміцинів на хроматограмі розчину порівняння	За п. 6 АНД, ДФУ 2.2.29, вид. 1

Закінчення табл.12.1.

Однорідність дозованих одиниць	Препарат має в середньому містити 85 - 115 % дозованості одиниці	За п. 7 АНД
Об'єм, що витягається	5 мл	За п. 8 АНД, ДФУ 2.9.17, вид. 1
Стерильність	Має витримувати випробування на стерильність	За п. 9 АНД, ДФУ 2.6.1, вип. 1
Бактеріальні ендотоксини	Менше 2,2 МО/мг	За п. 10 АНД, ДФУ 2.6.14, вип. 1
Аномальна токсичність	Має витримувати випробування на аномальну токсичність	За п. 11 АНД, ДФУ 2.6.9, вип. 1
Механічні включення	Мають бути відсутні	За п. 12 АНД, ДФУ 2.9.19, вид. 1
Кількісне визначення	Порівняння піків на хроматограмі	За п. 13 АНД, ДФУ 2.2.29, вид. 1

Методи контролю

1. Опис

Прозорий розчин червоного кольору. Визначають візуально.

2. Ідентифікація

До 10 мл рідкого продукту доливають 8 мл СНСІ₃-МеОН. Потім, до 1 мл одержаної суміші додають 2 мл ацетону-циклогексану. Відбирають 1 мл і до нього доливають 1 мл анісового альдегіду-Н₂SO₄. Має утворитися стійкий осад червоного кольору [5].

3. Прозорість

Для визначення прозорості і ступеня каламутності рідин використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. 40-мм шар випробовуваної рідини порівнюють із 40-мм шаром свіжоприготованого, як описано нижче, еталона. Порівняння рідин проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки вздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон I легко відрізнявся від води, а еталон II легко відрізнявся від еталона I.

Випробовувану рідину вважають прозорою, якщо вона витримує порівняння з водою.

Таблиця 11.2.

Еталонні розчини

	Еталон (мл)			
	I	II	III	IV
Основна суспензія	5	10	30	50
Вода	95	90	70	50

4. Кольоровість

Визначають згідно з ДФУ 2.2.2. вип 1.

2,0 мл випробовуваної рідини порівнюють з 2,0 мл води, використовуючи однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з зовнішнім діаметром 12 мм . Порівняння забарвлення проводять у розсіяному денному світлі, переглядаючи зразки горизонтально (перпендикулярно вісі пробірок) на білому фоні.

5. рН

Значення рН має становити 5,0-5,5 одиниць. Визначають згідно ДФУ 2.2.3, вид. 1.

Вимірювальним приладом є вольтметр з вхідним опором принаймні у 100 разів більшим за опір N використовуваних електродів. Прилад звичайно

градуюється в одиницях рН і повинен мати таку чутливість, щоб можна було виявити відмінність принаймні 0.05 одиниць рН або 0.003 В.

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату і одного з буферних розчинів з іншим значенням рН. Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням рН не мають відрізнятись більш як на 0.05 одиниць рН від табличного значення рН цього розчину. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють рН у тих самих умовах, що і для буферних розчинів. Якщо прилад використовують часто, його калібрування проводять регулярно . У противному разі калібрування приладу має проводитися перед кожним виміром.

Усі випробовувані розчини і стандартні буферні розчини мають бути приготовані на воді, вільній від діоксиду вуглецю.

Приготування стандартних буферних розчинів

0.05 М розчин калію тетраоксалату. 12.61 г $K_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ розчиняють у воді Рі доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл .

0.05 М розчин калію гідрофталату. 10.3 г $KHC_8H_4O_4$, попередньо висушеного при температурі від 110 °С до 135 °С до постійної маси , розчиняють у воді Рі доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл.

0,01 М розчин натрію тетраборату. 3.80 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ розчиняють у воді Рі доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000 мл . Зберігають, захищаючи від діоксиду вуглецю.

6. Однорідність дозованих одиниць

Використовуючи підходу аналітичну методику, визначають вміст діючої речовини в кожній з 10 дозованих одиниць лікарського засобу, відібраних за статистично обґрунтованою схемою.

Препарат витримує випробування, якщо вміст у кожній його однодозовій одиниці перебуває в межах 85 - 115 % від середнього вмісту. Препарат не витримує випробування, якщо вміст у більш як одній одиниці виходить за

вищезазначені межі або якщо вміст хоча б в одній одиниці виходить за межі 75 - 125 % від середнього вмісту. Якщо вміст в одній одиниці препарату виходить за межі 85 - 115 %, але перебуває у межах 75 - 125 %, визначають вміст у кожній з 20 додаткових однодозових одиниць препарату, відібраних за статистично обгрунтованою схемою. Препарат витримує випробування, якщо вміст не більш як в одній з проаналізованих 30 одиниць виходить за межі 85 - 115 % і в жодній одиниці не виходить за межі 75 - 125 % від середнього вмісту.

7. Супровідні домішки

Визначають згідно ДФУ 2.2.19, вид. 1

Обладнання звичайно складається з системи подавання рухомої фази, блока вводу проби (з використанням шприца або петлевого дозатора), хроматографічної колонки, детектора і реєструючого пристрою. Рухома фаза звичайно подається під тиском з однієї або декількох посудин і протікає через блок вводу проби, колонку. а потім через детектор із заданою швидкістю.

Температуру хроматографічної колонки підтримують постійною. Склад рухомої фази, залежно від зазначеного в окремій статті, може або залишатися постійним протягом всього аналізу (ізократичне елюювання),

або може змінюватися відповідно до заданої програми (градієнтне елюювання). Використовуваний детектор має забезпечувати визначення

тих кількостей аналізованих речовин, які елюються з колонки. Звичайно для детектування використовують абсорбційну спектрофотометрію; використовують також диференціальну рефрактометрію, флуориметрію, спалювання і електрохімічні методи.

Колонку врівноважують при зазначеному складі рухомої фази. Готують випробовуваний розчин і розчин(и) порівняння, як зазначено в окремій статті. Розчини не мають містити твердих часток. Використовуючи розчини порівняння, настроюють прилад і підбирають об'єми проб, що вводяться, які дозволяють одержати необхідний (адекватний) сигнал. Виконують повторні введення для перевірки збіжності сигналу і перевіряють, якщо необхідно, число теоретичних

тарілок. Вводять розчини і реєструють результати хроматографування. Для перевірки збіжності сигналу виконують повторні введення. Визначають площі піків аналізованих компонентів. У випадку, якщо коефіцієнт симетрії, обчислений, як описано нижче, має значення від 0.8 до 1.20, допускається проводити визначення за висотою піків. При використанні градієнтного елювання необхідно проводити визначення за площами піків. При використанні внутрішнього стандарту треба переконатися, що жоден з піків аналізованої речовини або його домішки не маскується піком внутрішнього стандарту. З одержаних значень обчислюють вміст визначуваного компонента або компонентів.

Коефіцієнт симетрії піка може бути обчислений за формулою:

$$\frac{b_{0,05}}{2A}$$

де: $b_{0,05}$ - ширина піка на одній двадцятій висоти піка:

$2A$ - відстань між перпендикуляром, опущеним з максимуму піка, і передньою межею піка на одній двадцятій висоти піка.

8. Об'єм, що витягається

Визначають згідно з ДФУ 2.9.17. вип 1.

Відбирають один флакон. Переносять вміст у сухий мірний циліндр такої місткості, щоб визначуваний об'єм заповнив не менше 40 % номінального об'єму циліндра. Вимірюють об'єм, що витягається. Об'єм, що витягається, має бути не меншим за номінальний об'єм зазначений на флаконі.

9. Стерильність

Визначають згідно ДФУ 2.6.1, вип. 1

Випробування на стерильність проводять за асептичних умов, використовуючи, наприклад, ламінар – бокс класу А, розташований у чистому приміщенні класу В або ізолятор. Заходи, що вживаються для попередження мікробного забруднення, не мають чинити впливу на мікроорганізми, які можуть

бути виявлені у зразку в результаті випробування. Умови треба регулярно контролювати шляхом аналізу проб, відібраних відповідним чином у робочій зоні.

Для проведення випробування на стерильність можуть бути використані живильні середовища, наведені нижче. Тіогліколеве середовище призначене для вирощування анаеробних бактерій, однак може бути також використане для виділення аеробних бактерій. Соєва-казеїнове середовище призначене для вирощування аеробних бактерій, а також може бути використане для виявлення грибів.

Тіогліколеве середовище (г/л)

Гідролізат казеїну - 15,00

Дріжджовий екстракт - 5,00

Глюкоза - 5,50

Натрію хлорид - 2,50

L-цистин - 0,50

Натрію тіогліколят - 0,50

Резазурін - 0,001

Агар-агар - 0,75

Кінцеве значення рН (при 25°C) $7,1 \pm 0,2$

Соєво-казеїнове живильне середовище (г/л)

Панкреатичний гідролізат казеїну - 17

Папаїновий гідролізат соєвої муки - 3

Натрію хлорид - 5

Дикалію гідрофосфат – 2,5

Глюкози моногідрат – 2,5

Агар-агар - 0,75

рН після стерилізації 7.3 ± 0.2

Декілька чашок Петрі з живильним середовищем інкубують при наступних температурах: 30-35 °C для визначення бактерій, 20-25 °C для виявлення грибів.

Визначення триває протягом 14 діб. Після закінчення періоду інкубації не має спостерігатися ріст мікроорганізмів.

10. Бактеріальні ендотоксини

Визначають згідно з ДФУ 2.6.14. вип 1.

Хромогенний метод відноситься до інструментальних спектрофотометричних методів кількісного визначення бактеріальних ендотоксинів. Принцип хромогенного кінетичного методу заснований на вимірюванні часу реакції, необхідного для розвитку певної інтенсивності забарвлення після звільнення барвника завдяки лізису хромогенного пептиду в присутності ендотоксинів. Концентрація бактеріальних ендотоксинів у розчині визначається за логарифмом часу реакції за допомогою калібрувального графіка. Чим вище концентрація ендотоксину, тим швидше протікає біохімічна реакція, та тим менше часу потрібно, щоб оптична густина досягла граничного значення. Вимірювання проводяться за допомогою спектрофотометра за довжини хвилі 405 нм.

11. Аномальна токсичність

Визначають згідно з ДФУ 2.6.9. вип 1.

Кількість випробовуваного лікарського засобу, зазначену в окремій статті, вводять внутрішньовенно кожній із п'яти здорових мишей масою від 17 г до 22 г. Розчин вводять протягом інтервалу часу від 15 с до 30 с. якщо немає інших зазначень в окремій статті. Зразок витримує випробування, якщо жодна з мишей не гине в межах 24 год або протягом часу, зазначеного в окремій статті. Якщо більш як одна тварина гине, зразок не проходить випробування. У випадку загибелі однієї тварини випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не гине в межах зазначеного інтервалу часу.

12. Механічні включення

Визначають згідно ДФУ 2.9.19, вид. 1

Для контролю використовують прилад, заснований на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість і розмір часток. Прилад калібрують, використовуючи дисперсійні зависі ФСЗ сферичних часток розміром від 5 мкм до 25 мкм. Стандартні частки дисперговані у воді, вільній від часток. Необхідно уникати агрегації часток дисперсійної фази.

Перемішують вміст зразка, повільно і безперервно перевертаючи контейнер п'ять разів. Якщо необхідно, обережно видаляють етикетки і ковпачки. Зовнішні поверхні контейнера, який розкривають, очищають струменем води, вільної від часток. Після розкривають контейнер, уникаючи внесення будь-якого забруднення. Для видалення бульбашок повітря дають відстоятися розчину протягом 2 хв.

Відбирають чотири проби, не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток з розмірами, що дорівнюють або перевищують значення, зазначені у відповідному нормативному документі. Виключають результат, одержаний для першої проби, і обраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку.

13. Кількісне визначення

Методика продовжує метод ідентифікації багреміцинів. Після одержання осаду, відбувається центрифугування зразку при 10000 об/хв протягом 5 хв. Після цього, до осаду багреміцинів додають 1 мл 20-% метанолу та повністю розчиняють його. Після цього, зразок визначають спектрофотометрично на довжині хвилі 280 нм. Одержану оптичну густину порівнюють з наявними даними по калібрувальному графіку [5].

14. Зберігання

У стерильному повітронепроникному контейнері з контролем першого розкриття. Зберігати при температурі не вище 25 °С у захищеному від світла та недоступному для дітей місці.

15. Маркування

Маркування із зазначенням серії, дати виготовлення, та терміну придатності. Окремо зазначається:

- субстанція стерильна;
- субстанція вільна від бактеріальних ендотоксинів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кушнірук Н., Пашаєва Р., Демочко Г. Антибіотикорезистентність як актуальна проблема майбутнього. Material 3th International scientific and practical conference “Theoretical aspects of education development”(Warsaw, Poland, January 24-27, 2023). 569 p. (p. 278).
2. Орищенко А. О. Шляхи модифікації антибіотиків для подолання резистентності. Студентський науковий вісник МНАУ. *Сільськогосподарські науки*. 2021., 1(16): 87-90
3. Wenciewicz T. A. Crossroads of antibiotic resistance and biosynthesis. *Journal of molecular biology*. 2019, 431(18): 3370-3399. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.033>
4. Ye J., Zhu Y., Hou B., Wu H., Zhang H. Characterization of the bagremycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. Tü 4128. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2019, 83(3): 482-489. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1553605>
5. Bertasso M., Holzenkaempfer M., Zeeck A., Dall'Antoniac F. A. B. I. O., Fiedler H. P. Bagremycin A and B, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. Tü 4128. *The Journal of antibiotics*. 2001, 54(9): 730-736. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.54.730>

6. Tsonis I., Karamani L., Xaplanteri P., Kolonitsiou F., Zampakis P., Gatzounis G., et al. Spontaneous cerebral abscess due to *Bacillus subtilis* in an immunocompetent male patient: A case report and review of literature. *World Journal of Clinical Cases*. 2018, 6(16): 1169. <https://doi.org/10.12998%2Fwjcc.v6.i16.1169>
7. Turnbull P. C., Kramer J. M., Melling J. *Bacillus*. *Medical microbiology*. 1996, 4.
8. Sinnelä M. T., Park Y. K., Lee J. H., Jeong K. C., Kim Y. W., Hwang H. J., Mah J. H. Effects of calcium and manganese on sporulation of *Bacillus* species involved in food poisoning and spoilage. *Foods*. 2019, 8(4): 119. <https://doi.org/10.3390/foods8040119>
9. Pagan F. S. Antibiotics for gram-positive organisms. *British journal of hospital medicine*. 1981, 25(1): 24-27.
10. Adimpong D. B., Sørensen K. I., Thorsen L., Stuer-Lauridsen B., Abdelgadir W. S., Nielsen D. S., et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*. 2012, 78(22): 7903-7914. <https://doi.org/10.1128%2FAEM.00730-12>
11. Harir M., Bendif H., Bellahcene M., Fortas Z., Pogni R. *Streptomyces* secondary metabolites. *Basic biology and applications of actinobacteria*. 2018, 6: 99-122. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79890>
12. Olanrewaju O. S., Babalola O. O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019, 103: 1179-1188. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>
13. Law J. W. F., Pusparajah P., Ab Mutalib N. S., Wong S. H., Goh B. H., Lee L. H. A review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of *Streptomyces* and novel species discovery. *Progress In Microbes & Molecular Biology*. 2019, 2(1). <http://dx.doi.org/10.36877/pmmb.a0000024>

14. Quinn G. A., Banat A. M., Abdelhameed A. M., Banat I. M. *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of medical microbiology*. 2020, 69(8): 1040. <https://doi.org/10.1099%2Fjmm.0.001232>
15. Elsalam R. M., Goh K. W., Mahadi M., Mohammad N., Kassab Y. W., Zin N. M., Chin K. Y. The Antibacterial Activities of Secondary Metabolites Derived from *Streptomyces* sp. *Progress In Microbes & Molecular Biology*. 2022, 5(1). <https://doi.org/a10.36877/pmmb.0000281>
16. Sivalingam P., Hong K., Pote J., Prabakar K. Extreme environment *Streptomyces*: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads?. *International Journal of Microbiology*. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>
17. Hui M. L. Y., Tan L. T. H., Letchumanan V., He Y. W., Fang C. M., Chan K. G., et al. The extremophilic actinobacteria: From microbes to medicine. *Antibiotics*. 2021, 10(6): 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>
18. Kemung H. M., Tan L. T. H., Khan T. M., Chan K. G., Pusparajah P., Goh B. H., Lee L. H. *Streptomyces* as a prominent resource of future anti-MRSA drugs. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9: 2221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02221>
19. Pusparajah P., Letchumanan V., Law J. W. F., Ab Mutalib N. S., Ong Y. S., Goh B. H., et al. *Streptomyces* sp.—a treasure trove of weapons to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm associated with biomedical devices. *International journal of molecular sciences*. 2021, 22(17): 9360. <https://doi.org/10.3390/ijms22179360>
20. Tan L. T. H., Chan K. G., Lee L. H., Goh B. H. *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Frontiers in microbiology*. 2016, 7: 79. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00079>
21. Cuozzo S., de LeBlanc A. D. M., LeBlanc J. G., Hoffmann N., Tortella G. R. *Streptomyces* genus as a source of probiotics and its potential for its use in health. *Microbiological Research*. 2023, 266: 127248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127248>

22. Zhang D., Shu C., Lian X., Zhang Z. New antibacterial bagremycins F and G from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ745. *Marine drugs*. 2018, 16(9): 330. <https://doi.org/10.3390/md16090330>
23. Tanvir R., Sajid I., Hasnain S., Kulik A., Grond S. Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydivorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation. *Microbiological research*. 2016, 185: 22-35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.003>
24. Nweze J. A., Mbaaji F. N., Huang G., Li Y., Yang L., Zhang Y., et al. Antibiotics development and the potentials of marine-derived compounds to stem the tide of multidrug-resistant pathogenic bacteria, fungi, and protozoa. *Marine Drugs*. 2020, 18(3): 145. <https://doi.org/10.3390/md18030145>
25. Martinet L., Naômé A., Baiwir D., De Pauw E., Mazzucchelli G., Rigali S. On the risks of phylogeny-based strain prioritization for drug discovery: *Streptomyces lunaelactis* as a case study. *Biomolecules*. 2020,10(7): 1027. <https://doi.org/10.3390/biom10071027>
26. van Bergeijk D. A., Terlouw B. R., Medema M. H., van Wezel G. P. Ecology and genomics of *Actinobacteria*: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*. 2020, 18(10): 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
27. Martinet L., Naômé A., Rezende L. C., Tellatin D., Pignon B., Docquier J. D., et al. Lunaemycins, New Cyclic Hexapeptide Antibiotics from the Cave Moonmilk-Dweller *Streptomyces lunaelactis* MM109T. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24(2): 1114. <https://doi.org/10.3390/ijms24021114>
28. Xu S., Tang L., Li X., Fan F., Liu Z. Immunotherapy for glioma: current management and future application. *Cancer letters*. 2020, 476: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.002>
29. Khotimchenko R., Bryukhovetskiy I., Khotimchenko M., Khotimchenko Y. Bioactive compounds with antiglioma activity from marine species. *Biomedicines*. 2021, 9(8): 886. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080886>

30. Liu Q., Yu T., Li X., Chen Y., Campbell K., Nielsen J., Chen Y. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals. *Nature communications*. 2019, 10(1): 4976. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12961-5>
31. Flourat A. L., Combes J., Bailly-Maitre-Grand C., Magnien K., Haudrechy A., Renault J. H., Allais F. Accessing p-Hydroxycinnamic Acids: Chemical Synthesis, Biomass Recovery, or Engineered Microbial Production?. *ChemSusChem*. 2021, 14(1): 118-129. <https://doi.org/10.1002/cssc.202002141>
32. Tippelt A., Nett M. *Saccharomyces cerevisiae* as host for the recombinant production of polyketides and nonribosomal peptides. *Microbial Cell Factories*. 2021, 20(1): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01650-y>
33. Rodriguez A., Kildegaard K. R., Li, M., Borodina I., Nielsen J. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. *Metabolic engineering*. 2015, 31: 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.08.003>
34. Kawaguchi H., Hasunuma T., Ogino C., Kondo A. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current opinion in biotechnology*. 2016, 42: 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.031c>
35. Borja G. M., Rodriguez A., Campbell K., Borodina I., Chen Y., Nielsen J. Metabolic engineering and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* producing p-coumaric acid from xylose. *Microbial Cell Factories*. 2019, 18(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1244-4>
36. Gu Y., Ma J., Zhu Y., Ding X., Xu P. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a chassis for de novo synthesis of five aromatic-derived natural products and chemicals. *ACS synthetic biology*. 2020, 9(8): 2096-2106. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00185>
37. Ferreira P. S., Victorelli F. D., Fonseca-Santos B., Chorilli M. A review of analytical methods for p-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2019, 49(1): 21-31. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1459173>

38. Gao E. B., Kyere-Yeboah K., Wu J., Qiu H. Photoautotrophic production of p-Coumaric acid using genetically engineered *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803. *Algal Research*. 2021, 54: 102180.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102180>
39. Kukil K., Lindberg P. Expression of phenylalanine ammonia lyases in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and subsequent improvements of sustainable production of phenylpropanoids. *Microbial cell factories*. 2022, 21(1): 1-16.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01735-8>
40. Mao J., Liu Q., Song X., Wang H., Feng H., Xu H., Qiao M. Combinatorial analysis of enzymatic bottlenecks of L-tyrosine pathway by p-coumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. 2017, 39: 977-982. DOI 10.1007/s10529-017-2322-5
41. Combes J., Imatoukene N., Couvreur J., Godon B., Brunissen F., Fojcik C., et al. Intensification of p-coumaric acid heterologous production using extractive biphasic fermentation. *Bioresource Technology*. 2021, 337: 125436.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125436>
42. Li Y., Mao J., Song X., Wu Y., Cai M., Wang H., et al. Optimization of the l-tyrosine metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by analyzing p-coumaric acid production. *3 Biotech*. 2020, 10: 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02223-3>
43. Rodriguez A., Chen Y., Khoomrung S., Özdemir E., Borodina I., Nielsen J. Comparison of the metabolic response to over-production of p-coumaric acid in two yeast strains. *Metabolic engineering*. 2017, 44: 265-272.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.10.013>
44. Liu D., Li B., Liu H., Guo X., Yuan Y. Profiling influences of gene overexpression on heterologous resveratrol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2017, 11: 117-125.
<https://doi.org/10.1007/s11705-016-1601-3>

45. Effendi S. S. W., Xue C., Tan S. I., Ng I. S. Whole-cell biocatalyst of recombinant tyrosine ammonia lyase with fusion protein and integrative chaperone in *Escherichia coli* for high-level p-Coumaric acid production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 2021, 128: 64-72.

<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.08.038>

46. Liu Y., Xu W., Xu W. Production of Trans-Cinnamic and p-Coumaric Acids in Engineered *E. coli*. *Catalysts.* 2022, 12(10): 1144.

<https://doi.org/10.3390/catal12101144>

47. Zhou S., Liu P., Chen J., Du G., Li H., Zhou J. Characterization of mutants of a tyrosine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Applied microbiology and biotechnology.* 2016, 100: 10443-10452. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7672-8>

48. Kawaguchi H., Sasaki K., Uematsu K., Tsuge Y., Teramura H., Okai N., et al. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from sweet sorghum juice by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology.* 2015, 198: 410-417. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.024>

49. Martinet L., Naômé A., Deflandre B., Maciejewska M., Tellatin D., Tenconi E., et al. A single biosynthetic gene cluster is responsible for the production of bagremycin antibiotics and ferroverdin iron chelators. *MBio.* 2019, 10(4): e01230-19.

<https://doi.org/10.1128/mBio.01230-19>

50. Kawaguchi H., Hasunuma T., Ohnishi Y., Sazuka T., Kondo A., Ogino C. Enhanced production of γ -amino acid 3-amino-4-hydroxybenzoic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen limitation. *Microbial Cell Factories.* 2021, 20: 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01714-z>

51. Nag A., Ali M. A., Kawaguchi H., Saito S., Kawasaki Y., Miyazaki S., et al. Ultrahigh thermoresistant lightweight bioplastics developed from fermentation products of cellulosic feedstock. *Advanced Sustainable Systems.* 2021, 5(1): 2000193.

<https://doi.org/10.1002/adsu.202000193>

52. Dawra M., El Rayess Y., El Beyrouthy M., Nehme N., El Hage R., Taillandier P., Bouajila J. Biological activities and chemical characterization of the

Lebanese endemic plant *Origanum ehrenbergii* Boiss. *Flavour and Fragrance Journal*. 2021, 36(3): 339-351. <https://doi.org/10.1002/ffj.3646>

53. Mou J. H., Qin Z. H., Yang Y. F., Liu S. F., Yan W., Zhang L., et al. Navigating Practical Applications of Food Waste Valorisation Based on the Effects of Food Waste Origins and Storage Conditions. *Available at SSRN 4381291*. 2023. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4381291>

54. Niimi-Nakamura S., Kawaguchi H., Uematsu K., Teramura H., Nakamura-Tsuruta S., Kashiwagi N., et al. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from glucose and/or xylose via recombinant *Streptomyces lividans*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2022, 68(2): 109-116. doi 10.2323/jgam.2022.06.001

55. Lenzen C., Wynands B., Otto M., Bolzenius J., Mennicken P., Blank L. M., Wierckx N. High-yield production of 4-hydroxybenzoate from glucose or glycerol by an engineered *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019, 7: 130. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00130>

56. Pugh S., McKenna R., Osman M., Thompson B., Nielsen D. R. Rational engineering of a novel pathway for producing the aromatic compounds p-hydroxybenzoate, protocatechuate, and catechol in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 2014, 49(11): 1843-1850. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.08.011>

57. Maxel S., Aspacio D., King E., Zhang L., Acosta A. P., Li H. A growth-based, high-throughput selection platform enables remodeling of 4-hydroxybenzoate hydroxylase active site. *ACS catalysis*. 2020, 10(12): 6969-6974. <https://doi.org/10.1021%2Facsatal.0c01892>

58. Purwanto H., Kang M. S., Ferrer L., Han S. S., Lee J. Y., Kim H. S., Lee J. H. Rational engineering of the shikimate and related pathways in *Corynebacterium glutamicum* for 4-hydroxybenzoate production. *Journal of biotechnology*. 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.016>

59. Martinet L., Baiwir D., Mazzucchelli G., Rigali S. Structure of New Ferroverdins Recruiting Unconventional Ferrous Iron Chelating Agents. *Biomolecules*. 2022, 12(6): 752. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fbiom12060752>

60. Waldman A. J., Ng T. L., Wang P., Balskus E. P. Heteroatom–heteroatom bond formation in natural product biosynthesis. *Chemical Reviews*. 2017, 117(8): 5784-5863. <https://doi.org/10.1021%2Facs.chemrev.6b00621>
61. Kalasariya H. S., Patel N. B., Yadav A., Perveen K., Yadav V. K., Munshi F. M., et al. Characterization of fatty acids, polysaccharides, amino acids, and minerals in marine macroalga *Chaetomorpha crassa* and evaluation of their potentials in skin cosmetics. *Molecules*. 2021, 26(24): 7515. <https://doi.org/10.3390/molecules26247515>
62. Nicholls A. J., Barber T., Baxendale I. R. The synthesis and utility of metal-nitrosophenolato compounds—highlighting the Baudisch reaction. *Molecules*. 2019, 24(22): 4018. <https://doi.org/10.3390/molecules24224018>
63. Maciejewska M., Pessi I. S., Arguelles-Arias A., Noirfalise P., Luis G., Ongena M., et al. *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel ferroverdin A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015, 107: 519-531. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0348-4>
64. Zhang S., Wu J., Jiang Z., Zhang L., Song T., Liu X., et al. Pigments of aminophenoxazinones and viridomycins produced by termite-associated *Streptomyces tanashiensis* BYF-112. *Frontiers in Microbiology*. 2022, 13. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2022.1110811>
65. Voytsekhovskaya I. V., Axenov-Gribanov D. V., Murzina S. A., Pekkoeva S. N., Protasov E. S., Gamaiunov S. V., Timofeyev M. A. Estimation of antimicrobial activities and fatty acid composition of actinobacteria isolated from water surface of underground lakes from Badzheyskaya and Okhotnichya caves in Siberia. *PeerJ*. 2018, 6: e5832. <https://doi.org/10.7717/peerj.5832>
66. Liu F., Xu D., Zhang Y., Zhu Y., Ye J., Zhang H. Identification of BagI as a positive transcriptional regulator of bagremycin biosynthesis in engineered *Streptomyces* sp. Tü 4128. *Microbiological Research*. 2015, 173: 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.011>
67. Huang Y., Zhao N., He L., Wang L., Liu Z., You M., Guan F. *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *Journal of clinical*

microbiology. 2005, 43(3): 1451-1455. <https://doi.org/10.1128%2FJCM.43.3.1451-1455.2005>

68. Deutch C. E., Bui A. P., Ho T. Growth of *Paenarthrobacter aureescens* strain TC1 on atrazine and isopropylamine during osmotic stress. *Annals of Microbiology*. 2018, 68: 569-577. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1364-9>

69. Díaz S. N., Moya J. M. G. L., Bayo S. M., Lou M. I. M. *Arthrobacter creatinolyticus*: An emerging human pathogen causing urinary tract infection. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (English ed.). 2020, 38(2): 88-89. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2019.02.015>

70. Бичек Т. П. Сучасні погляди на етіологічні особливості інфекцій сечового міхура. Матеріал міжнародної науковопрактичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії» (м. Львів, 22–23 жовтня 2021 року). С. 6-11

71. Schwartz D., Grammel N., Heinzelmann E., Keller U., Wohlleben W. Phosphinothricin tripeptide synthetases in *Streptomyces viridochromogenes* Tu494. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005, 49(11): 4598-4607. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.11.4598-4607.2005>

72. Weitnauer G., Mühlenweg A., Trefzer A., Hoffmeister D., Süßmuth R. D., Jung G., et al. Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the avi biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and production of new antibiotics. *Chemistry & biology*. 2001, 8(6): 569-581. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00040-0)

73. *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40110 is a spore-forming, mesophilic bacterium that builds an aerial mycelium. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/16109>

74. Flindt M. L. H. Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. *The Lancet*. 1969, 293(7607): 1177-1181. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)92165-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)92165-5)

75. Tokano M., Tarumoto N., Imai K., Sakai J., Maeda T., Kawamura T., et al. A Case of Bacterial Meningitis Caused by *Bacillus subtilis* var. natto. *Internal Medicine*. 2023, 0768-22. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.0768-22>
76. Smith D. A., Nehring S. M. Bacteremia. StatPearls Publishing. 2022.
77. Lefort A., Fantin B. Purulent meningitis. *La Revue du Praticien*. 2001, 51(6): 603-607.
78. Crowe-McAuliffe C., Graf M., Huter P., Takada H., Abdelshahid M., Nováček J., et al. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018, 115(36): 8978-8983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808535115>
79. Munoz P., Bouza E., Cuenca-Estrella M., Eiros J. M., Pérez M. J., Sánchez-Somolinos M., et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clinical infectious diseases*. 2005, 40(11): 1625-1634. <https://doi.org/10.1086/429916>
80. Algazaq J. N., Akrami K., Martinez F., McCutchan A., Bharti A. R. *Saccharomyces cerevisiae* laryngitis and oral lesions in a patient with laryngeal carcinoma. *Case reports in infectious diseases*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2941527>
81. Lee P., Goldman D. L. Cryptococcosis and other rare invasive yeasts infections. In *Pediatric Transplant and Oncology Infectious Diseases*. 2020. P. 206-213). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-64198-2.00036-1>
82. Baker's Yeast Worsens Crohn's Disease, Study Suggests. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ibdnewstoday.com/2017/03/13/study-indicates-crohns-worsens-when-bakers-yeast-is-in-the-gut/#:~:text=cerevisiae%2C%20a%20species%20of%20yeast,has%20not%20been%20s-pelled%20out.>
83. Antibiotics and Crohn's Disease: Help or Hurt? [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.webmd.com/ibd-crohns-disease/crohns-disease/crohns-disease->

[antibiotics#:~:text=The%20most%20commonly%20prescribed%20antibiotics,part%20of%20the%20small%20intestine.](#)

84. Candida Albicans. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/22961-candida-albicans>

85. Antibiotics Market by Class (Beta Lactam & Beta Lactamase, Quinolones, Macrolides, and Others), Drug Origin (Natural, Semisynthetic, and Synthetic), Spectrum of Activity (Broad-spectrum Antibiotic and Narrow-spectrum Antibiotic), and Route of Administration (Oral, Intravenous, and Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2018 – 2025. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alliedmarketresearch.com/antibiotics-market>

86. Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. The Journal of organic chemistry, 78(9), 4207-4213. <https://doi.org/10.1021%2Fjo400236f>

87. Антибіотики за рецептом: як реагують пацієнти та чим небезпечно самолікування цими препаратами. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://suspilne.media/315564-antibiotiki-za-receptom-ak-reaguut-pacienti-ta-cim-nebezpecne-samolikuвання-cimi-preparatami/>

88. Receiving antibiotics without a prescription. [Електронний ресурс].
Режим доступу: https://www.google.com/search?q=receiving+antibiotics+without+a+prescription&rlz=1C1GCEA_enUA842UA842&sxsrf=APwXEdfX1tLJ7o9IMJy3yVINorpoKhe6lQ%3A1683895183942&ei=jzNeZK2O0dKhIqEIkZCwDg&ved=0ahUKEwjtkZyy5u_-AhXSUOUKHYgIBOYQ4dUDCA8&uact=5&oq=receiving+antibiotics+without+a+prescription&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcnAQA0oECEEYAFAAWABgAGgAcAF4AIBAIgBAJIBAJgBAKABAqABAQ&sclient=gws-wiz-serp

89. 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/>

[8F-%D1%81%D0%BE%D0%BB%D1%8C-%D1%81%D0%B0%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%B7/7019/](#)

100. Лікарські форми для ін'єкцій. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://stud.com.ua/27638/meditsina/likarski_formi_inyektsiy

101. Pharma IQ Glossary: Bioavailability. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharma-iq.com/glossary/bioavailability>

102. ІН'ЄКЦІЙНЕ ТА ІНФУЗІЙНЕ ВВЕДЕННЯ ЛІКІВ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://profimed.com.ua/likuval-no-profilaktychnyy-pidrozdil/sestryns-ki-manipuliatsii/in-iektsiayne-ta-infuziayne-vvedennia-likiv/>

103. Bertasso M., Holzenkaempfer M., Zeeck A., Dall'Antoniac F. A. B. I. O., Fiedler H. P. Bagremycin A and B, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. Tü 4128. The Journal of antibiotics. 2001, 54(9): 730-736. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.54.730>

104. 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

105. Внутрішньовенні ін'єкції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://naurok.com.ua/vnutrishnovenni-in-ekci-prezentaciya-278327.html>

106. Рідкі лікарські форми. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://naurok.com.ua/ridki-likarski-formi-133182.html>

107. Технологія плазмозамінюючих розчинів. Розчини для ін'єкцій з термолабільними речовинами. Суспензії для ін'єкцій. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://atl.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2023/02/plazmozaminjuvalni-rozchini.-rozchini-dlja-iniekcij-z-termolabilnimi-rechovinami.-suspenszii-dlja-iniekcij.pdf>

108. Serdons, K., Verbruggen, A., & Bormans, G. (2008). The presence of ethanol in radiopharmaceutical injections. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(12), 2071-2071. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.057026>

109. Carraretto A. R., Curi E. F., Almeida C. E. D. D., Abatti R. E. M. Glass ampoules: risks and benefits. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2011, 61: 517-521. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70059-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70059-9)
110. Технологія BFS – видув-наповнення-запайка. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://butlerpartner.com/ua/stati/farmatsevtika-i-kosmetika/237-tekhnologiya-bfs-vyduv-napolnenie-zapajka>
111. Blow-Fill-Seal. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://gmpua.com/Equipment/Sterile/BlowFillSeal/index.html>
112. "Blow-Fill-Seal". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nikopharm.ua/proizvodstvo/tekhnologiya/>
113. ІНСТРУМЕНТИ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3339/instrumenti-dlya-in-yekcij>
114. Бонвива розчин 3 мг/3 мл шпр.-тюб. №1. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medtabletko.online/oporno-dvigatelnyj-apparat/bonviva-rastvor-3-mg3-ml-shpr-tyub-1>
115. ТОВАРОЗНАВЧИЙ АНАЛІЗ ІНСТРУМЕНТІВ ТА АПАРАТІВ ДЛЯ ПРОКОЛІВ, ІН'ЄКЦІЙ І ТРАНСФУЗІЙ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tovaroved.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/06/Inyektsijni-zasobi.pdf>
116. Guazzo D. M. Parenteral product container closure integrity testing. In *Pharmaceutical Dosage Forms-Parenteral Medications*. CRC Press. 2016. P. 372-402
117. Hamdali, H., Lebrihi, A., Monje, M. C., Benharref, A., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., & Virolle, M. J. (2021). A molecule of the viridomycin family originating from a *Streptomyces griseus*-related strain has the ability to solubilize rock phosphate and to inhibit microbial growth. *Antibiotics*, 10(1), 72. 2021, 10, 72. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010072>
118. Поліетилен Purell. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p181935979-polietilen-15803-020.html?&primelead=MS4xNzU>

119. Поліетилен: користь чи шкода. Властивості поліетилену та його застосування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://planetaplast.com/poliethylen-vlastyvosti-ta-zastosuvannya/>
120. ПЕТ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://megachem.com.ua/polietilentereftalat-pet.html>
121. Переробка поліетилентерефталату. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ua.chinaquimicos.com/info/recycling-polyethylene-terephthalate-43988797.html>
122. Сырье, химические продукты, Полиэтиленовая Смола Cz 328, в наличии, цена. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/Raw-Material-Chemical-Products-Pet-Resin-1600796763300.html>
123. Полимерные смолы Zeon Zeonex 480/480R Cyclo Olefin (COP). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/COP-Zeon-Zeonex-480-480R-62514276800.html>
124. Topas Cyclic Olefin Copolymer Recognized for Recyclability with PE Film. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ptonline.com/news/topas-cyclic-olefin-copolymer-recognized-for-recyclability-with-pe-film>
125. СОС TOPAS E-140 OMER (E140) циклоолефиновая сополимерная смола. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/СОС-TOPAS-Elastomer-E-140-E140-62514886369.html>
126. Zhu Y.; Liao S.; Ye J.; Zhang H. Cloning and characterization of a novel tyrosine ammonia lyase-encoding gene involved in bagremycins biosynthesis in *Streptomyces* sp.. 2012, 34(2): 269–274. doi:10.1007/s10529-011-0755-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22065278/>
127. Інфекційний ендокардит. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://empendium.com/ua/chapter/B27.II.2.13>.

128. Douglas N. M., Hennessy J. N., Currie B. J., Baird R. W. Trends in bacteremia over 2 decades in the top end of the northern territory of Australia. In *Open Forum Infectious Diseases*. 2020, 7(11): ofaa472. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa472>

129. Holmes C. L., Anderson M. T., Mobley H. L., Bachman M. A. Pathogenesis of Gram-negative bacteremia. *Clinical microbiology reviews*. 2021, 34(2): e00234-20. <https://doi.org/10.1128%2FCMR.00234-20>

130. Вже навіть не 40 мільйонів: в ООН порахували, скільки людей живе в Україні. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://24tv.ua/skilki-lyudey-zhive-ukrayini-stanom-2023-rik_n2298287

131. Vacitracin for Injection, USP. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00048379.PDF

132. Vacitracin for Injection. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/USP35-NF30/2295-2296%20Vacitracin%20for%20Injection.pdf>

133. Даптоміцин-Віста. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[35554\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[35554])

134. Інфекції, викликані нетифоїдними штамами *Salmonella*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.msdmanuals.com/uk/professional/infectious-diseases/gram-negative-bacilli/nontyphoidal-salmonella-infections#:~:text=%D0%A2%D1%80%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D0%BB%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C%20%D0%BB%D1%96%D0%BA%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D1%81%D1%82%D1%96%D0%B9%D0%BA%D0%BE%D1%97%20%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D1%96%D1%94%D0%BC%D1%96%D1%97%20%D0%B7%D0%B0%D0%B7%D0%B2%D0%B8%D1%87%D0%B0%D0%B9,%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0%20%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D1%82%D0%B8%20%D1%89%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%B9%D0%B>

[C%D0%B5%D0%BD%D1%88%D0%B5%204%20%D1%82%D0%B8%D0%B6%D0%BD%D1%96.](#)

135. ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙ, ЗУМОВЛЕНИХ STAPHYLOCOCCUS AUREUS. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://msvitu.com/archive/2006/january/article-2.php>

136. Біотум пор. д/ін. 1000 мг. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://helsi.me/liki/sumy/biotum/167169/instruction>

137. Зріст та вага дитини. Таблиця норм від 0 до 11 років. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kolizhanka.com.ua/zrist-ta-vaga-dytyny-tablytsya-norm-vid-0-do-11-rokiv/>

138. Держстат розрахував портрет середньостатистичного українця. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://lb.ua/society/2021/08/10/491375_derzhstat_rozrahuvav_portret.html#:~:text=%D0%A1%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%BD%D1%96%20%D0%B7%D1%80%D1%96%D1%81%D1%82%20%D1%96%20%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%B0%20%D1%83%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%81%D1%8C%D0%BA%D0%B8%D1%85,%D1%82%D0%B0%2071%20%D0%BA%D1%96%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%20\(%D0%B6%D1%96%D0%BD%D0%BA%D0%B8\).](https://lb.ua/society/2021/08/10/491375_derzhstat_rozrahuvav_portret.html#:~:text=%D0%A1%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%BD%D1%96%20%D0%B7%D1%80%D1%96%D1%81%D1%82%20%D1%96%20%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%B0%20%D1%83%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%81%D1%8C%D0%BA%D0%B8%D1%85,%D1%82%D0%B0%2071%20%D0%BA%D1%96%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%20(%D0%B6%D1%96%D0%BD%D0%BA%D0%B8).)

139. Демографічна трагедія України: другий голодомор? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.epravda.com.ua/publications/2022/06/28/688487/>

140. Number of bacteremia cases caused by antibiotic-resistant bacteria in 2021, by age group. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.statista.com/statistics/874131/cases-of-bacteremia-caused-by-antibiotic-resistant-bacteria-by-age-in-italy/>

141. Gill H., Sykes E. M., Kumar A., Sorensen J. L. Isolation of bioactive metabolites from soil derived fungus-*Aspergillus fumigatus*. *Microorganisms*. 2023, 11(3): 590. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030590>

142. Zhao J., Ou S., Ding S., Wang Y., Wang Y. Effect of activated charcoal treatment of alkaline hydrolysates from sugarcane bagasse on purification of p-coumaric acid. *Chemical engineering research and design*. 2011, 89(10): 2176-2181. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.02.010>
143. Puls J. S., Brajtenbach D., Schneider T., Kubitscheck U., Grein F. Inhibition of peptidoglycan synthesis is sufficient for total arrest of *Staphylococcal* cell division. *Science advances*. 2023, 9(12): eade9023. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9023>
144. Nikkilä I., Waldén M., Maina N. H., Tenkanen M., Mikkonen K. S. Fungal cell biomass from enzyme industry as a sustainable source of hydrocolloids. *Frontiers in Chemical Engineering*. 2020, 2: 574072. <https://doi.org/10.3389/fceng.2020.574072>
145. ЕКСТРАКЦІЯ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2323/ekstrakciya>
146. Zhang D., Shu C., Lian X., Zhang Z. New antibacterial bagremycins F and G from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ745. *Marine drugs*. 2018, 16(9): 330. <https://doi.org/10.3390/md16090330>
147. Kim L., Marriott P. J. Preparative gas chromatography. *Gas chromatography*, 1st edition. Elsevier, Inc., Waltham, MA. 2012. P. 395-414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00016-X>
148. Катіоніти: сфера використання. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://universalexport.com.ua/ua/blog/kationity-sfera-ispolzovaniya>
149. Cysewski P., Przybyłek M., Kowalska A., Tymorek N. Thermodynamics and intermolecular interactions of nicotinamide in neat and binary solutions: Experimental measurements and COSMO-RS concentration dependent reactions investigations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(14): 7365. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22147365>
150. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

151. 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>

152. Norsyamimi H., Masturah M., Nurina A., Syarul N. B. Solvent selection in extraction of essential oil and bioactive compounds from *Polygonum minus*. *Journal of Applied Sciences*. 2014, 14(13): 1440-1444. <https://doi.org/10.3923/jas.2014.1440.1444>

153. Mundkinajeddu D., Agarwal A. Residual methanol in botanical dietary ingredients—perspectives of a manufacturer. *HerbalEGram*. 2014, 11(8): 1-4.

154. Zhu L., Rajendram M., Huang K. C. Effects of fixation on bacterial cellular dimensions and integrity. *Iscience*. 2021, 24(4): 102348. <https://doi.org/10.1016%2Fj.isci.2021.102348>

155. Ballio A., Bertholdt H., Carilli A., Chain E. B., Vittorio V. D., Tonolo A., Vero-Barcellona L. Studies on feroverdin, a green iron-containing pigment produced by a *Streptomyces* Wak. species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. 1963, 158(970): 43-70.

156. Chain E. B., Tonolo A., Carilli A. Feroverdin, a green pigment containing iron produced by a *streptomycete*. *Nature*. 1955, 176(4483): 645-645.

157. Zhu Y., Xu D., Liao S., Ye J., Zhang H. Cloning and characterization of bagB and bagC, two co-transcribed genes involved in bagremycin biosynthesis in

Streptomyces sp. Tü 4128. *Annals of microbiology*. 2013, 63(1): 167-172.
<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0457-0>

158. Вивчення класифікації, конструкції та принципу дії сушарок. Методичні вказівки для студентів спеціальність 181 «Харчові технології, - Таврійський державний агротехнологічний університет, 2017 – 17с.

159. Температури плавлення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zvarka.info/temperatura-plavlennya-metaliv/#:~:text=%D0%A6%D0%B5%20%D0%B2%D0%B5%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%B0%2C%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%20%D1%8F%D0%BA%D1%96%D0%B9%20%D0%BF%D0%BE%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%B0%D1%94%D1%82%D1%8C%D1%81%D1%8F,%D0%9C%D1%96%D0%B6%20%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D1%8E%20%D0%B2%D0%BE%D0%BD%D0%B8%20%D0%BF%D1%80%D1%8F%D0%BC%D0%BE%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D1%80%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D1%96%20>.

160. Температурний режим – сушка. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://techtrend.com.ua/index.php?newsid=16933>

161. Furnaces and Dryers. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.lac.cz/en/furnaces-and-dryers?gclid=EAIaIQobChMI4-KBjYlh_wIVGqzVCh0glAWxEAAAYASAAEgLqevD_BwE

162. Bocian S. Solvation processes in liquid chromatography: The importance and measurements. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2016, 39(16): 731-738. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1242494>

163. Papava G., Gurgenshvili M., Chitrekashvili I., Gavashelidze E., Nazi G. Ionites on the Basis of Clinoptilolite. *International Academy Journal Web of Scholar*. 2019, (10 (40)): 39-41. https://doi.org/10.31435/rsglobal_wos/31102019/6740

164. Yang S. T., Huang H., Tay A., Qin W., De Guzman L., San Nicolas E. C. Extractive fermentation for the production of carboxylic acids. In *Bioprocessing for*

value-added products from renewable resources. Elsevier. 2007. P. 421-446.
<https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50017-7>

165. Шибанов В. В., Репета В. Б., Кукура Ю. А., Слободяник В. Г. Регенерація розчину для вимивання фотополімерних друкарських форм як вирішення екологічної проблеми. *Вісник Вінницького політехнічного інституту*. 2022, (6): 18-22. <https://doi.org/10.31649/1997-9266-2022-165-6-18-22>

166. Регенерація – метанол. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://techtrend.com.ua/index.php?newsid=15059>

167. ДИСТИЛЯТ ЧИ РЕКТИФІКАТ – У ЧОМУ РІЗНИЦЯ? Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://budmo-mdd.com.ua/ua/a477558-distillyat-ili-rectifikat.html>

168. Розділення однорідних сумішей. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.miyklas.com.ua/p/himija/7-klas/pochatkovi-khimichni-poniattia-39391/sposobi-rozdilennia-sumishei-39131/re-900f15c3-250e-48ac-bf21-6f7ed8f3353a#:~:text=%D0%9F%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B3%D0%BE%D0%BD%D0%BA%D0%B0%20\(%D0%B4%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BB%D1%8F%D1%86%D1%96%D1%8F\)%20E2%80%94%20%D1%80%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%96%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%80%D1%96%D0%B4%D0%BD%D0%B8%D1%85,%D1%85%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%8E%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D1%8E%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%BE%D1%85%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%BF%D0%B0%D1%80%D1%96%D0%B2.](https://www.miyklas.com.ua/p/himija/7-klas/pochatkovi-khimichni-poniattia-39391/sposobi-rozdilennia-sumishei-39131/re-900f15c3-250e-48ac-bf21-6f7ed8f3353a#:~:text=%D0%9F%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B3%D0%BE%D0%BD%D0%BA%D0%B0%20(%D0%B4%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BB%D1%8F%D1%86%D1%96%D1%8F)%20E2%80%94%20%D1%80%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%96%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%80%D1%96%D0%B4%D0%BD%D0%B8%D1%85,%D1%85%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%8E%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D1%8E%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%BE%D1%85%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%BF%D0%B0%D1%80%D1%96%D0%B2.)

169. АГРІНОЛ ОЛИВА-ТЕПЛОНОСІЙ АМТ-300 (ТЕМПЕРАТУРА ДО 280 °С). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://masla-smazki.com/ua/p4231007-agrinol-maslo-teplonositel.html>

170. Resin Regeneration Fundamentals. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.wqpmag.com/filtration/resin/article/10954042/resin-regeneration-fundamentals>

171. Li Y. S., Dong Y. L. Determination of anion-exchange resin performance based on facile chloride-ion monitoring by FIA-spectrophotometry with applications to water treatment operation. *Analytical sciences*. 2004, 20(5): 831-836. <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.20.831>

172. Abdulwahab G., Saidat O. G., İsmail B., Süleyman K. Simulations and Economic Analyses of Ethyl Acetate Productions by Conventional and Reactive Distillation Processes Using Aspen Plus. *International Journal of Engineering Research & Technology*. 2013, 2(8): 594-605.

173. Концентратоміри. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.svaltera.ua/catalog/765/>

174. Лабораторний вимірювач концентрації кислоти або лугу SX5150. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p1125890906-laboratornyj-izmeritel-kontsentratsii.html>

175. Набор ареометров АСП-3 (0-40, 40-70, 70-100) + цилиндр 100 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1793967731-nabor-areometrov-asp.html>

176. Ваги лабораторні ТВЕ-0,5-0,01-а-2 (НПВ: 500 г, d=0,01 г, платформа Ø120 мм, внутрешня калібровка). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unipro.com.ua/ua/vagy-laboratorni-tve-0-5-0-01-2--npv--500-g--d-0-01-g--platforma--120-mm--vnutrennyaya-kalibrovka/>

177. Ваги для визначення вологості МА 50/1.R. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://labormarket.com.ua/ua/p1424415952-vagi-dlya-viznachennya.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=18377678563&utm_network=x&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=&utm_term=&gclid=CjwKCAjw6vyiBhB

EiwAQJRopizKRvHA7j0UZcjTyn7IT2kNTiGjX7TtLGpBEiDxCG_QTCVriZ8QYBoCwv8QAvD_BwE

178. KAIDA 16000 rpm 6 tubes 6 x 50ml dual air cooling benchtop high speed laboratory centrifuge. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Price-Centrifuge-Centrifuge-KAIDA-16000-Rpm_1282121809.html?spm=a2700.7735675.0.0.4fe5MkwrMkwrjc&s=p

179. Спектрофотометр Shimadzu UV-1900 / UV1900i. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://labtorg.kz/analytical-equipment/spectrometry/uv1900spectrophotometer.html>

180. Виробництво стерильної продукції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://buklib.net/books/36219/>

181. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 «Галузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с.

182. Сучасні дезінфікуючі засоби в медицині. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.galecotrade.com/dezinfikuyuchi-zasoby-v-medytsyni/>

183. Антисептика комби сурфейс 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezinsept.com.ua/product/antiseptica-combi-surface/>

184. Дезінфекція Деканаль для високого рівня дезінфекції та стерилізації. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://antiseptika.prom.ua/ua/p807818-dezsredstvo-dekanal-dlya.html>

185. Віроцид, 10 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vetpreparaty.com/virotsid-10-l/>

186. ТЕНТАМИН ПЛЮС (Концентрат) засіб дезінфікуючий універсальне, не хлорсодержащее 1л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zhenskiy-ray.com.ua/ua/p581657912-tentamin-plyus-kontsentrat.html>

187. Дезинфіцируюче средство Унидез ультра (UniDez Ultra) 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezsredsua.ub.ua/ru/goods/view/21300487/all/dezinfikuyuchiy-zasib-unidez-ultra-unidez-ultra-1-1/>

188. ДЕЗІНФЕКЦІЙНИЙ ЗАСІБ «НЕОДЕЗ ЕКСТРА», 1 КГ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://browin.ua/ua/p1751659688-dezinfektsijnij-zasib-neodez.html>

189. Вернедор-преміум для дезінфекції та миття поверхонь 1000 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://sangig.com.ua/ua/p1496538351-vernedor-premium-dlya.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA7t6sBhAiEiwAsaieYgj0F1ln_ORqJb1sI224cHW9cM9OF2nemA_r_J2zuNo2OsSv8dfc8xoCwvMQAvD_BwE

190. Максисан (1л) флакон/дозатор, дезсредство для поверхностей, инструментов, Украина. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/dezinfektsiya/maksisan-1-1-flakon-dozator-y-01-0007.html>

191. Дезекон, 1 л – флакон-дозатор (Украина) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://hlorka.in.ua/p1537967088-dezekon-flakon-dozator.html?source=merchant_center&utm_source=google.pm&utm_medium=cpc&utm_campaign=performance_max_ru&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA7t6sBhAiEiwAsaieYgsEuBtvdfUTd3vBcQdf-g8huUvrf-DHitgEH2K6B_jAQCIfczivoBoCPM4QAvD_BwE

192. Высокоточная ПВХ Медицинская катетерная трубка Экструзионная машина | Экструдер SONGHU. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ru.songhu3dprint.com/product/high-precision-medical-catheter-tubing-extrusion-machine.html>

193. Практичний посібник з курсу “Промислова екологія” для студентів спеціальності 6.040106 “Екологія, охорона навколишнього середовища та

збалансоване природокористування”/ Укл. Гомеля М.Д., Іваненко О.І., Шаблій Т.О., Носачова Ю.В., Отрох О.А. – К.: НТУУ “КПІ”, 2010. – 48 с. – Укр. мовою.

194. Поняття про жорсткість води та способи її усунення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kypubd.kiev.ua/wp-content/uploads/2020/11/20.11-urok-35-36-34-gr-himiya-bondarkova.pdf>

195. 5 Liter Stainless Steel Bio Biological Reactor with Agitator. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mosende.en.made-in-china.com/productimage/BwVfeTKrAicI-2f1j00HsPizDdMfLkB/China-5-Liter-Stainless-Steel-Bio-Biological-Reactor-with-Agitator.html>

196. Bfs Blow Fill Seal Machine Plastic Ampoule Blowing Filling and Sealing Machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lucybian.en.made-in-china.com/product/BSLJEVaKnskv/China-Bfs-Blow-Fill-Seal-Machine-Plastic-Ampoule-Blowing-Filling-and-Sealing-Machine.html>

197. Ampoule Inspection Machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sedpharma.com/product/ampoule-inspection-machine-sed-djil/>

198. Promatic P 91 series cartoners. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.romaco.com/products/product-details/p-91-series>