

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

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

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична
біотехнологія»

на тему: «Протеолітичні ферменти в косметичній та фармацевтичній
галузі»

Виконала: здобувач(-ка) II курсу, групи 01

ФОФАНОВА Єва Сергіївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНИКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Ярослав СМІТЮХ

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач(-ка) _____

(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична

біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ФОФАНОВОЇ Єви Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Протеолітичні ферменти в косметичній та фармацевтичній галузі

керівник роботи д.т.н., проф. СТАБНИКОВ В.П.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024р. № 875-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Bacillus cereus*. Продукт: кератиназа.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Огляд літератури. Техніко-економічне обґрунтування кератинази. Обґрунтування післяферментаційних етапів виробництва кератинази. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях. Специфікація обладнання для одержання кератинази. Опис технологічної схеми отримання субстанції кератинази. Контроль виробництва субстанції кератинази. Технологічні особливості отримання косметичного засобу проти акне. Складання патентної заявки

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема: 1 аркуш формату А1, 1 аркуш формату А3.

Апаратурна схема: 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	07.10.2024-16.10.2024	
2.	РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування кератинази	17.10.2024-24.10.2024	
3.	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування післяферментаційних етапів виробництва кератинази	24.10.2024-27.10.2024	
4.	РОЗДІЛ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	27.10.2024-02.11.2024	
5.	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання для одержання кератинази	02.11.2024-06.11.2024	
6.	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми отримання субстанції кератинази	06.11.2024-08.11.2024	
7.	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції кератинази	08.11.2024-10.11.2024	
8.	РОЗДІЛ 8. Технологічні особливості отримання косметичного засобу проти акне	10.11.2024-11.11.2024	
9.	РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки. Спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення	11.11.2024-12.11.2024	
10.	Графічна частина	12.11.2024-13.11.2024	
11.	Оформлення роботи та списку джерел	13.11.2024-14.11.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Єва ФОФАНОВА _____
(ім'я та прізвище)

Віктор СТАБНИКОВ _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The topic of current qualification work concerns the design of a technology for obtaining the keratinase enzyme by cultivating *Bacillus cereus* L10. Just as keratinases can liquefy dead cells, as well as keratin that blocks the sebaceous glands, the use of keratinase in cosmetics can effectively affect the rate of acne treatment. It is proposed to use keratinase *B. cereus* L10 as part of an enzymatic peeling to combat post-acne and acne during remission. The annual need for keratinase for use as part of an anti-acne peeling is 150.1 kg. For 300 working days, taking into account 20% losses, the geometric volume of fermenter is 3 m³ with a filling factor of 0.6.

The technological scheme for the isolation and purification of keratinase after *B. cereus* L10 cultivation includes the following stages: centrifugation of culture liquid, supernatant ultrafiltration, adsorption of keratinase, ultrafiltration of the keratinase eluate and keratinase lyophilization. Control of the keratinase substance production includes determination of the enzyme substance appearance, keratinase activity and water content (moisture). The release form of the anti-acne peeling in the form of a gel is adopted. The use of laminate tubes as the primary packaging for keratinase peeling is proposed. Each tube of peeling will be placed in a cardboard box. The production of peeling gel involves the stages of preparing the gel base, keratinase solution, a mixture of panthenol and glycerin, mixing all components with subsequent homogenization, filling the tubes and packaging. Technical conditions for keratinase peeling gel have also been developed.

The qualification work contains 9 sections, includes 3 figures, 7 tables, 118 references, is presented on 106 pages. The graphic part includes technological and equipment diagrams (3 drawings of A1 format and 1 drawing of A3 format, respectively).

Keywords: keratinase, *Bacillus cereus*, peeling, acne, ultrafiltration, keratinolytic activity, gel, tubes, specifications.

РЕФЕРАТ

Тема кваліфікаційної роботи стосується проектування технології одержання ферменту кератинази культивуванням *Bacillus cereus* L10. Подібно до того, як кератинази можуть розріджувати відмерлі клітини, а також кератин, який блокує сальні залози, застосування кератинази у складі косметичних засобів може ефективно впливати на темп лікування акне. Запропоновано використання кератинази *B. cereus* L10 у складі ензимного пілінгу для боротьби з постакне та акне у період ремісії. Річна потреба в кератиназі для застосування у складі пілінгу проти акне складає 150,1 кг. За 300 трудоднів з урахуванням 20% втрат геометричний об'єм ферментера становить 3 м³ при коефіцієнті заповнення 0,6.

Технологічна схема виділення та очищення кератинази після культивування *B. cereus* L10 включає проведення таких стадій: центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація супернатанту, адсорбція кератинази, ультрафільтрація елюату кератинази та сушіння кератинази сублімацією. Контроль виробництва субстанції кератинази включає визначення опису субстанції ферменту, активності кератинази та вмісту води (вологості). Прийнято форму випуску пілінгу проти акне у формі гелю. Запропоновано використання ламінатних туб як первинного пакування для пілінгу з кератиназою. Кожна туба з пілінгом буде поміщена у картонну коробку. Виробництво гелю пілінгу передбачає стадії приготування гелевої основи, розчину кератинази, суміші патенолу з гліцерином, змішування всіх складових з наступною гомогенізацією, наповненням туб і пакуванням. Також розроблено технічні умови на гель пілінг з кератиназою.

Кваліфікаційна робота містить 9 розділів, включає 3 рисунків, 7 таблиць, 118 посилань, представлена на 106 сторінках. Графічна частина включає технологічні та апаратурні схеми (3 креслення формату А1 та 1 креслення формату А3 відповідно).

Ключові слова: кератиназа, *Bacillus cereus*, пілінг, акне, ультрафільтрація, кератинолітична активність, гель, туби, технічні умови.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Загальна характеристика протеолітичних ферментів	11
1.2. Особливості мікробного синтезу протеаз	14
1.2.1. Кератиназа	14
1.2.2. Колагеназа	19
1.2.3. Еластаза.....	24
1.3. Практичне використання протеолітичних ферментів	30
1.3.1. Фармацевтична промисловість.....	30
1.3.2. Косметична галузь.....	34
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КЕРАТИНАЗИ	37
2.1. Потреба у ферментних косметичних засобах проти акне	37
2.2. Розрахунок річної потужності виробництва.....	41
2.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера	41
2.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 3 м ³	42
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ЕТАПІВ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ.....	46
3.1. Відділення біомаси від культуральної рідини	47
3.2. Ультрафільтрація.....	49
3.3. Адсорбція кератинази	50
3.4. Очищення кератинази	51
3.5. Висушування кератинази.....	53
РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ	57
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ КЕРАТИНАЗИ	61
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ КЕРАТИНАЗИ	63
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ КЕРАТИНАЗИ	66
РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КОСМЕТИЧНОГО ЗАСОБУ ПРОТИ АКНЕ	68
8.1. Обґрунтування кінцевої форми, упаковки та вибору форми випуску	68

8.2. Технологія виробництва пілінгу з кератиназою	75
8.3. Специфікація обладнання для отримання гелю пілінгу.....	79
8.4. Опис технологічного процесу виробництва пілінгу з кератиназою.....	81
8.5. Методи контролю. Технічні умови нагель пілінг з кератиназою	83
РОЗДІЛ 9. СКЛАДАННЯ ПАТЕНТНОЇ ЗАЯВКИ. СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ	
ПРЕПАРАТУ ТРИПСИН-ПОДІБНИХ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ДЛЯ	
ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО ВВЕДЕННЯ	
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	93

ВСТУП

Протеолітичні ферменти здатні гідролізувати пептидні зв'язки і їх також називають пептидазами, протеазами або протеїназами. Фізіологічна функція протеаз є вкрай важливою для всіх живих організмів від вірусів до людини. Протеолітичні ферменти можна класифікувати на основі їх походження: виділять ферменти мікробного (бактеріальні, грибові та вірусні), рослинного, тваринного походження [1].

Протеолітичні ферменти належать до класу ферментів гідролаз і об'єднані в підклас пептидних гідролаз або пептидаз. Залежно від місця дії ферменту протеази також можна розділити на екзопептидази та ендопептидази. Екзопептидази каталізують гідроліз пептидних зв'язків поблизу N- або C -кінцевих кінців субстрату. Амінопептидази можуть вивільняти окремі амінокислоти (ЕС 3.4.11), дипептиди (дипептидилпептидази, ЕС 3.4.14) або трипептиди (трипептидилпептидази ЕС 3.4.14) з N-кінцевого кінця своїх субстратів. Окремі амінокислоти можуть вивільнятися з дипептидних субстратів за допомогою дипептидаз (ЕС 3.4.13) або з поліпептидів за допомогою карбоксипептидаз (ЕС 3.4.16-3.4.18), тоді як пептидилдипептидази (ЕС 3.4.15) вивільняють дипептиди з C-кінцевого кінця поліпептидного ланцюга. Ендопептидази розщеплюють пептидні зв'язки всередині та на відстані від кінців поліпептидного ланцюга.

На основі каталітичного механізму та наявності амінокислотного залишку в активному центрі протеази поділяють на аспарагінові протеази, цистеїнові протеази, глутамінові протеази, металопротеази, аспарагінові протеази, серинові протеази, треонінові протеази та протеази зі змішаним або невідомим каталітичним механізмом [1].

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Фофанова Є.С.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					8	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Комерційно доступними мікробними протеазами є кислотні або лужні за своєю природою ферменти, які синтезуються видами роду *Bacillus*. Представники роду *Pseudomonas* є грамнегативними бактеріями, які головним чином відповідають за утворення протеолітичних ферментів. Лужні протеази є найпоширенішими протеазами, що синтезуються бактеріями роду *Pseudomonas*, зокрема штамми виду *Pseudomonas aeruginosa* [2].

Протеолітичні ферменти є одним із класів промислових ферментів, їх глобальний попит швидко зростає. На даний клас ферментів припадає 20% із частки 60% світового ринку ензимів. Протеолітичні ферменти широко використовуються в різноманітних галузях промисловості та біотехнології, включаючи виробництво харчових продуктів, фармацевтики, шкіряну промисловість, виробництво хлібобулочних виробів, миючих засобів, для розм'якшення м'яса, пивоваріння тощо.

Так, протеази використовують в процесах дублення, видалення шерсті в шкіряній промисловості. Зокрема, завдяки своїй еластолітичній та кератинолітичній функції в шкіряній промисловості все частіше використовується лужна протеаза. Повідомляють, що протеази, ліпази та кератинази є найбільш широко використовуваними ферментами в шкіряній промисловості.

Ферменти протеази відіграють важливу роль у взаємодії бактерій, нематод і рослинного середовища, вони функціонують як головні фактори балансу нематод у ґрунті. Дослідження механізму дії *Bacillus spp* проти нематод теоретично підвищує цінність цих організмів як ефективних агентів боротьби з нематодами та сприяє розробці нових стратегій біологічного контролю.

Протеази проявляють терапевтичний потенціал при лікуванні раку. Кілька досліджень повідомили про перспективність використання протеаз, що беруть участь в апоптозі, які вводяться за допомогою методів генної терапії, для вибіркового знищення ракових клітин [2].

Розглядаючи основні групи протеолітичних ферментів та їх місце у промисловості, лужні протеази є унікальними за своєю активністю та

підтримують постійне лужне значення рН при їх використанні у фармацевтичній, харчовій та інших суміжних галузях. Широкий діапазон застосування лужних протеаз привертає все більше уваги з боку дослідників з надією відкриття нових штамів з унікальними властивостями та значною активністю. Наразі лужні протеази активно застосовують у виробництві миючих засобів [3].

Кислі протеази стабільні й активні в діапазоні рН від 3,8 до 5,6 і часто використовуються в харчовій промисловості – для очищення пива та фруктового соку, покращення текстури борошняного тіста, розм'якшення м'яса тощо. Своє місце у харчовій промисловості знайшли і нейтральні протеази. Нейтральні протеази є активними при нейтральному або слабокислому чи слаболужному рН. Здебільшого нейтральні протеази синтезуються представниками роду *Bacillus* і мають відносно низьку терmostійкість у діапазоні рН від 5 до 8.

У свою чергу, фермент кератиназа (ЕС 3.4.99.11) є однією з груп серингідролаз, які руйнують дисульфідні водневі зв'язки в білках. Фермент також має здатність до зв'язування іонів металу з іонами кальцію. Це означає, що іони кальцію діють як кофактори для кератиназ; присутність іонів кальцію в середовищі може посилити їх активність. Структура кератинази робить її дуже ефективною у виконанні функції розкладання білків кератину. Органічні відходи містять велику кількість кератину, який залишається нерозкладеним через складність структури. Такі нерозчинні кератини можуть призвести до забруднення навколишнього середовища при відсутності пошуку способів їх утилізації. Таким чином, перспективною є обробка таких відходів ферментними препаратами кератиназ, які перетворюють відходи на простіші речовини, що легко розкладаються біологічним шляхом. Цей факт засвідчує, що використання мікробних ферментних препаратів, зокрема кератиназ, забезпечує набагато вищі показники ефективності дії, порівняно з хімічними засобами [3].

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика протеолітичних ферментів

Протеази беруть участь у регуляції численних фізіологічних шляхів, вони виявляють селективність до широкого діапазону субстратів і мають різноманітні структурні особливості. Вони використовуються в різноманітних промислових процесах і займають частку 60% від загального числа промислово цінних ферментів [4]. Протеолітичні ферменти здатні гідролізувати пептидні зв'язки, їх також називають пептидазами, протеазами або протеїназами [1].

Протеолітичні ферменти належать до класу ферментів гідролаз і об'єднані в підклас пептидних гідролаз або пептидаз. Залежно від місця дії ферменту протеази також можна розділити на екзопептидази та ендопептидази. Екзопептидази каталізують гідроліз пептидних зв'язків поблизу N- або C -кінцевих кінців субстрату. Амінопептидази можуть вивільняти окремі амінокислоти (ЕС 3.4.11), дипептиди (дипептидилпептидази, ЕС 3.4.14) або трипептиди (трипептидилпептидази ЕС 3.4.14) з N-кінцевого кінця своїх субстратів. Окремі амінокислоти можуть вивільнятися з дипептидних субстратів за допомогою дипептидаз (ЕС 3.4.13) або з поліпептидів за допомогою карбоксипептидаз (ЕС 3.4.16-3.4.18), тоді як пептидилдипептидази (ЕС 3.4.15) вивільняють дипептиди з C-кінцевого кінця поліпептидного ланцюга. Ендопептидази розщеплюють пептидні зв'язки всередині та на відстані від кінців поліпептидного ланцюга.

На основі каталітичного механізму та наявності амінокислотного залишку в активному центрі протеази поділяють на аспарагінові протеази, цистеїнові протеази, глутамінові протеази, металопротеази, аспарагінові протеази, серинові протеази, треонінові протеази та протеази зі змішаним або невідомим каталітичним механізмом [1].

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Фофанова Є.С.					11	26
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

Комерційно доступними мікробними протеазами є кислотні або лужні за своєю природою ферменти, які синтезуються видами роду *Bacillus*. Представники роду *Pseudomonas* є грамнегативними бактеріями, які головним чином відповідають за утворення протеолітичних ферментів. Лужні протеази є найпоширенішими протеазами, що синтезуються бактеріями роду *Pseudomonas*, зокрема штамми виду *Pseudomonas aeruginosa* [2].

Протеолітичні ферменти є одним із класів промислових ферментів, їх глобальний попит швидко зростає. На даний клас ферментів припадає 20% із частки 60% світового ринку ензимів. Протеолітичні ферменти широко використовуються в різноманітних галузях промисловості та біотехнології, включаючи виробництво харчових продуктів, фармацевтики, шкіряну промисловість, виробництво хлібобулочних виробів, миючих засобів, для розм'якшення м'яса, пивоваріння тощо.

Так, протеази використовують в процесах дублення, видалення шерсті в шкіряній промисловості. Зокрема, завдяки своїй еластолітичній та кератинолітичній функції в шкіряній промисловості все частіше використовується лужна протеаза. Повіdomляють, що протеази, ліпази та кератинази є найбільш широко використовуваними ферментами в шкіряній промисловості.

Ферменти протеази відіграють важливу роль у взаємодії бактерій, нематод і рослинного середовища, вони функціонують як головні фактори балансу нематод у ґрунті. Дослідження механізму дії *Bacillus spp* проти нематод теоретично підвищує цінність цих організмів як ефективних агентів боротьби з нематодами та сприяє розробці нових стратегій біологічного контролю.

Протеази проявляють терапевтичний потенціал при лікуванні раку. Кілька досліджень повідомили про перспективність використання протеаз, що беруть участь в апоптозі, які вводяться за допомогою методів генної терапії, для вибіркового знищення ракових клітин [2].

Розглядаючи основні групи протеолітичних ферментів та їх місце у промисловості, лужні протеази є унікальними за своєю активністю та

підтримують постійне лужне значення рН при їх використанні у фармацевтичній, харчовій та інших суміжних галузях. Широкий діапазон застосування лужних протеаз привертає все більше уваги з боку дослідників з надією відкриття нових штамів з унікальними властивостями та значною активністю. Наразі лужні протеази активно застосовують у виробництві миючих засобів [3].

Кислі протеази стабільні й активні в діапазоні рН від 3,8 до 5,6 і часто використовуються в харчовій промисловості – для очищення пива та фруктового соку, покращення текстури борошняного тіста, розм'якшення м'яса тощо. Своє місце у харчовій промисловості знайшли і нейтральні протеази. Нейтральні протеази є активними при нейтральному або слабнокислому чи слаболужному рН. Здебільшого нейтральні протеази синтезуються представниками роду *Bacillus* і мають відносно низьку терmostійкість у діапазоні рН від 5 до 8.

У свою чергу, фермент кератиназа (ЕС 3.4.99.11) є однією з груп серингідролаз, які руйнують дисульфідні водневі зв'язки в білках. Фермент також має здатність до зв'язування іонів металу з іонами кальцію. Це означає, що іони кальцію діють як кофактори для кератиназ; присутність іонів кальцію в середовищі може посилити їх активність. Структура кератинази робить її дуже ефективною у виконанні функції розкладання білків кератину. Органічні відходи містять велику кількість кератину, який залишається нерозкладеним через складність структури. Такі нерозчинні кератини можуть призвести до забруднення навколишнього середовища при відсутності пошуку способів їх утилізації. Таким чином, перспективною є обробка таких відходів ферментними препаратами кератиназ, які перетворюють відходи на простіші речовини, що легко розкладаються біологічним шляхом. Цей факт засвідчує, що використання мікробних ферментних препаратів, зокрема кератиназ, забезпечує набагато вищі показники ефективності дії, порівняно з хімічними засобами [3].

1.2. Особливості мікробного синтезу протеаз

На відміну від ферментів рослинного походження, мікробні протеази проявляють біологічну активність на клітинному рівні та мають значну економічну перспективу. Також мікробні протеази знайшли широке використання в біотехнологічному промисловому секторі [5].

1.2.1. Кератиназа

Мікробні кератинази — це універсальні протеази, використання яких постійно набирає обертів у біотехнології завдяки їх ефективній біоконверсії складних відходів багатих кератином і сталому впровадженню екологічного виробництва. Біодеградація кератинових матеріалів за допомогою кератиназ відновила перспективи використання економічно ефективних агропромислових відходів як легкодоступних субстратів для виробництва високоцінних продуктів, включаючи ферменти, амінокислоти та біоактивні пептиди [6].

Повідомлялося про потенціал синтезу кератинази бактеріями таких родів: *Bacillus*, *Vibrio*, *Chryseobacterium*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Fervidobacterium*, *Microbacterium*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Geobacillus Amycolatopsis*, *Meiothermus*, *Paenibacillus*. Також наявні відомості про виробництво кератинази представниками актинобактерій, зокрема *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Bevibacterium* та *Nocardiopsis*.

Встановлено, що кератинолітичні гриби є природними колонізаторами ороговілих субстратів і відіграють важливу роль у природному гідролізі ороговілих тканин. Серед них виділяють – *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Doratomyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Onygena*, *Cladosporium*, *Microsporum*, *Lichtheimia*, *Chrysosporium*, *Aphanoascus*, *Trichophyton*, *Scopulariopsis*.

Незважаючи на те, що в літературі представлено інформацію про потенціал виробництва кератиназ різними мікробними видами, великомасштабне виробництво завжди було проблемою з комерційної точки зору. Власні клітинні попередники, умови культивування та доступність поживних речовин є важливими факторами, які впливають на виробництво

мікробних метаболітів. Генетичне різноманіття кератинолітичних мікроорганізмів впливає на довільний вибір фізико-хімічних умов їх культивування [6].

Кератини, синтезовані в епітеліальних клітинах, є невід'ємною частиною епідермісу та його похідних, включаючи волосся, шерсть, пір'я, нігті, роги, копита та кутикулу. Кератини утворюють тверді структури, які утримуються дисульфідними зв'язками, утвореними між тіоловими групами ($-SH$) залишків амінокислот цистеїну, водневими зв'язками та гідрофобними взаємодіями. Кератини пташиного пір'я містять приблизно в 2,5 рази більше залишків цистину, що утворюються в результаті з'єднання двох залишків цистеїну дисульфідним містком, ніж кератини нігтів, рогів або епідермісу. Тому літературні джерела містять статті, автори яких використовували пташине пір'я в ролі субстрату для отримання кератиназ [7].

Так, дослідження [8] спрямоване на оцінку виробництва кератинази із використанням штаму *Bacillus cereus* ПРК35 для подальшого застосування у складі промислових миючих засобів. Внаслідок проведення оптимізації при культивуванні продуцента в якості джерела вуглецю використовували куряче пір'я, що дозволило отримати кератиназу активністю 103,79 Од/мл через 96 год вирощування. Утворення сульфіту у фільтраті культури свідчить про можливу мінералізацію сірки дисульфідредуктазою, що виробляється *B. cereus* ПРК35. За оптимізованих умов безклітинний ферментований бульйон був збагачений амінокислотами: треоніном (8,52 мкг/мл), серином (7,55 мкг/мл) і фенілаланіном (7,13 мкг/мл) [8].

Синтез та характеристику наночасток срібла з кератиназою за наявності кератину пір'я досліджували автори роботи [9]. Фермент кератиназа, отриманий з *Bacillus* sp. NCIM 5802, був ковалентно зв'язаний з наночастками срібла, утворюючи нанокмплекс кератинази. Отриманий нанокмплекс продемонстрував оптимальну активність при рН 10,0 та температурі 60 °С, а також стабільність у присутності різних інгібіторів, іонів металів, поверхнево-активних речовин і детергентів [9].

Біохімічна характеристика та застосування кератинази з *Bacillus thuringiensis* MT1 з одночасною утилізацією відходів шерсті описано в статті [10]. Отриманий фермент проявив оптимальну активність 422 Од/мл при температурі 50 °C і рН 9 з молекулярною масою 80 кДа.

Інші дослідники вивчали виробництво кератинази штаму *Bacillus cereus* YQ15, стійкої до поверхнево-активних речовин, як компонента миючого засобу. Внаслідок оптимізації умов культивування та компонентів поживного середовища, максимальна активність кератинази становила 925 Од/мл через 36 год культивування за температури 35 °C і швидкості перемішування середовища 160 об/хв [11].

Отриманню термостабільної кератинази присвячена і праця [12]. Найперспективніший ізолят, кодований як L10, продемонстрував найвищу ефективність деградації пір'я 72,7 % і був ідентифікований як *B. cereus* L10. Даний штам вирощували в середовищі з курячим пір'ям у кількості 1%. Було підтверджено оптимальні параметри, що призвело до підвищення рівня синтезу кератинази до значення активності 9602 Од/мл, концентрації білка 521,17 мкг/мл і ступеня деградації пір'я 94%. Одержаний фермент є повністю стабільним при температурі від 30 до 80 °C протягом 1 години і зберігає 97,66% своєї активності при 100 °C. Крім того, визначили, що штам *B. cereus* L10 здатний руйнувати різні типи кератину [12].

Kokwe зі співавторами також досліджували можливість синтезу термостабільної кератинази [13]. Ізоляти, кодовані як SSN-01 і HSN-01, були ідентифіковані як *Bacillus* sp. NFH5 і *Bacillus* sp. FHNМ. Продукція позаклітинного ферменту та генерація тіолової групи штамом *Bacillus* sp. NFH5 досягли піку через 120 годин до значень $1879,09 \pm 88,70$ Од/мл та $9,49 \pm 0,78$ мМ відповідно. Активність кератинази була найвищою при рН 8,0 і температурі 90 °C, але інгібувалась ЕДТА та 1,10-фенантроліном. Результати цього дослідження підкреслюють роль *Bacillus* sp. NFH5 у біопереробці стійких кератинових відходів до білкових гідролізатів – потенційних дієтичних добавок до кормів для худоби [13].

У статті [14] повідомляється про очищення позаклітинної термостабільної кератинази, отриманої зі штаму *Caldicoprobacter algeriensis* TH7C1T – термофільної анаеробної бактерії, виділеної з гідротермального гарячого джерела в Алжирі. Максимальну активність кератинази зареєстрували після 24-годинного культивування при 50 °C – значення активності склало 21000 Од/мл. При цьому, як джерело вуглецю використовували борошно з курячого пір'я.

Лужні протеази - це ферменти, які проявляють активність в діапазоні pH від нейтрального до лужного. Такі ензими можуть мати сериновий центр (тріада AspHis-Ser у його каталітичному центрі) і називатись сериновими протеазами або можуть потребувати іонів металу для каталізу – металопротеази [15].

У праці [16] автори дослідили перспективний кератинолітичний штам бактерій для біоконверсії твердих відходів домашньої птиці. Кератинолітичну бактерію було виділено з ґрунтів поблизу бійні та ідентифіковано як *Bacillus pumilus* AR57 шляхом секвенування 16S рРНК. Оптимальна активність неочищеного ферменту виявлялась при pH 9 і 45 °C. *Bacillus pumilus* AR57 продемонстрував повну деградацію (100%) білого курячого пір'я, внесеного у кількості 1% протягом 18 год вирощування в модифікованому мінімальному середовищі з додаванням ДМСО (1%) при швидкості перемішування 150 об/хв за температури 37°C.

Іншими дослідниками була отримана нова серинова лужна протеаза (позначена як SAPGB) із штаму *Gracilibacillus boracitolerans* LO15 з активністю 9000 Од/мл [17]. Фермент показав оптимальну активність при 65°C і pH 10. Максимальна активність була досягнута в діапазоні 0,5–5М NaCl і близько 52% активності зберігалось в широкому діапазоні наявності хлориду натрію (0–30%).

Кератиназопозитивна бактерія, виділена із зразків ґрунту промислової зони шкіряного заводу Хазарібаг, Дакка, була ідентифікована як *Arthrobacter* і підтверджена як *Arthrobacter* sp. NFH5 шляхом секвенування гену 16S рРНК. Кератин і порошок пір'я (10 г/л або 1%) були хорошими субстратами для

найвищого виробництва кератинази разом із дріжджовим екстрактом (0,2 г/л або 0,02%) як джерелом органічного азоту та нітратом калію (1 г або 0,1%) як джерело неорганічного азоту. Максимальну активність кератинази 26,44 Од/мл досягли після 24 годин вирощування при 37 °С з початковим рН 7,0 та швидкості перемішування 150 об/хв [18].

Доведено, що *B. subtilis* S14 виробляє кератиназу KerS14 з потенційним застосуванням у шкіряній промисловості, оскільки цей фермент не пошкоджує бичачий колаген. У роботі [19] представлено оптимізацію середовища, що складається з пир'яного борошна (15 г/л) та CaCl₂ (10,5 г/л) для виробництва кератинази. Максимальна продукція кератинази 5,5 Од/мл спостерігалась при швидкості аерації 1 об/об/хв, перемішуванні 400 об/хв і швидкості масопереносу кисню 24,48 год⁻¹.

Результати статті [20] засвідчили, що активність кератинази досягала максимуму при 50°C для *Pseudomonas* sp. та *B. cereus* (штам не наведено), тоді як оптимум рН був 10,0 для обох біологічних агентів. Найвищу кератиназну активність $74,66 \pm 1,52$ Од/мл спостерігали для *B. cereus* (штам не наведено), а для *Pseudomonas* sp. – $57,66 \pm 2,52$ Од/мл відповідно.

Гриб *Didymella keratinophila* AUMC 15399 був зафіксований в Єгипті. Фермент кератиназа, продукований методом твердофазного культивування у середовищі з порошком пир'я, показав найкращі результати активності при рН 7,0 і 45 °С – 44903 ± 1555 Од/мг. Однак йони Mn²⁺ найбільш ефективний інгібуючий вплив на кератиназу [21].

У дослідженні [22] *Pseudomonas aeruginosa* SU-1 продукував кератиназу в оптимальних умовах: 4 доби вирощування, рН – 7, температура 37 °С. Отримували фермент з активністю 23,7 Од/мл.

Основною метою роботи [23] була оптимізація продукції кератинази штаму *Bacillus* sp. UPM-AAG1. Оптимум температури становив 31,66 °С, рН – 6,87. Використовуючи відходи у вигляді пир'я, вдалось одержати кератиназу з активністю 60,55 Од/мл.

Бактерія *Bacillus licheniformis* MKU3, що розкладає кератин, виділяє кератиназу, яка має потенційний промисловий інтерес. У праці [24] ген кератинази внутрішньоклітинно експресувався в *Escherichia coli* BL21(DE3) за допомогою вектора pET-21b (+). Позитивну бактеріальну колонію BL21 (містить рекомбінантний вектор експресії) інкубували протягом ночі при 37°C (180 об/хв) у середовищі LB. Активність неочищеного екстракту ферменту склала 620 Од/мл.

1.2.2. Колагеназа

Колагени є важливими компонентами позаклітинного матриксу у тканинах ссавців, таких як шкіра, зв'язки та сухожилля. На сьогодні ідентифіковано 40 генів колагену хребетних. Ці гени утворюють принаймні 28 різних молекул колагену, фібрилярних або нефібрилярних молекул, які послідовно пронумеровані римськими цифрами (I–XXVIII). Фібрилярні колагени мають високу термічну стабільність і сильну механічну міцність. Шкіра ссавців складається з різних типів колагенів, таких як типи I, III, IV і VII, серед яких колагени типу I і типу III є основними типами фібрилярного колагену. Найпоширенішим колагеном є колаген I типу, молекула якого складається з трьох α -поліпептидів (двох $\alpha 1(I)$ -ланцюгів і одного $\alpha 2(I)$ -ланцюга), які накручені один навколо одного, утворюючи потрійну спіраль, і на обох кінцях мають потрійну спіраль - це неспіральні фрагменти, які називаються телопептидами. Нативний колаген типу I дуже стійкий до звичайних протеаз, таких як трипсин і хімотрипсин, тоді як ферменти з колагенолітичною активністю, такі як матрична металопротеїназа-1 (ММР-1; також відома як інтерстиціальна колагеназа), виявляють здатність розщеплювати колаген типу I у потрійному спіральному домені [25].

Найбільш широко вивченими колагеназами є матриксні металопротеїнази тварин і бактеріальні колагенази мікроорганізмів. Матриксні металопротеїнази — це сімейство багатодомених протеолітичних ферментів, що містять іони цинку. Вони здатні розкладати поліпептиди в позаклітинному матриксі і відіграють важливу роль у фізіологічних і патологічних процесах. Бактеріальні

колагенази в основному синтезуються мікроорганізмами – представниками родів *Clostridium* і *Vibrio* [25].

Бактеріальні ферменти ефективно розділяють колаген у багатьох місцях, розщеплюючи його на короткі пептидні фрагменти. Завдяки своїй здатності перетравлювати колаген у позаклітинному матриксі, бактеріальні колагенази вважаються важливими факторами вірулентності, разом із додатковими деградуючими ферментами, такими як еластаза. Крім того, колагенази використовуються в сільському господарстві та харчовій промисловості, наприклад, проти рослинних патогенів та при обробці м'яса. У той час як вищезазначене вимагає інгібування колагенази, у багатьох галузях своє використання можуть знайти колагенази, синтез яких було оптимізовано, внаслідок цього ці ензими мають вищу активність і стабільність. Так, такі ферменти знаходять своє застосування у фармацевтиці та медицині – наприклад, при хворобах Дюпюїтрена та Пейроні, а також для лікування опіків і ран. Крім того, бактеріальні колагенази були досліджені як перспективні мішені для пригнічення бактеріальної інвазії без впливу на життєздатність бактерій. Дослідження важливої ролі бактеріальних колагеназ сприяло подальшому вивченню біохімічних і структурних властивостей даної групи ензимів [26].

Колагенази, синтезовані *Clostridium histolyticum*, є першими колагеназами, які були відкриті та детально вивчені. Хоча наразі відомо, що інші мікроорганізми також здатні до виробництва колагеназ, терміни «бактеріальна колагеназа» та «мікробна колагеназа» стали синонімами терміну «колагенази клостридій». Фільтрат культури *C. histolyticum* містить суміш колагеназ та інших протеїназ, які виявляють потужну гідролітичну активність щодо сполучної тканини. Відповідно, такі неочищені ферментні препарати набули популярності в якості реагентів для досліджень з дисоціації тканин, тому і є одними з найбільш продаваних ферментних продуктів [27].

Відомо, що *C. histolyticum* є патогенним анаеробом, який викликає газову гангрену. Усі штами даної бактерії виробляють колагеназу, ймовірно, як засіб

для вторгнення в організм господаря і з метою розкладання білка в даному середовищі в якості субстрату. Препарати клостридіальної колагенази беруть участь у виділенні гепатоцитів, адипоцитів та інших клітин для дослідницьких цілей. Також такі ензимні засоби використовують у медицині – підготовка судинних ендотеліальних клітин для посіву судинних протезів та виділення фрагментів підшлункової залози для трансплантації. Використання препаратів колагенази, синтезованої представниками роду *Clostridium*, зіштовхується з проблемами відтворюваності, що пов'язані з їх змінним протеолітичним складом. Препарат клостридіальної колагенази під назвою Santyl виробляється компанією Biospecifics Technologies і схвалений для використання при лікуванні пролежнів. Окрім цього, наразі досліджується пряме використання клостридіальної колагенази в лікуванні міжхребцевих гриж [27].

Оптимізація компонентів середовища дуже важлива для підвищення рівня синтезу колагеназ. У більшості наявних літературних робіт колагеназу отримували шляхом глибинного способу культивування. Для виробництва колагенази використовувалися різні компоненти поживного середовища, наприклад очищені субстрати, такі як нативний колаген, желатин, риб'ячий колаген, і необроблені субстрати, такі як риб'яча шкіра, риб'яча луска, бичачі та морські субпродукти [28].

Очищення є дуже важливим кроком для вивчення біохімічних, біофізичних і структурних характеристик, а також застосування специфічних колагеназ. В літературі налічується вкрай мало відомостей про очищення мікробних колагеназ, однак серед наявних дослідники в якості продуцентів використовували такі мікроорганізми: *Bacillus licheniformis* F11.4, *Pseudomonas* sp. SUK, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas marinoglutinosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Rathayibacter* sp., *Penicillium aurantiogriseum* URM4622, *Bacillus cereus* MBL13, *Clostridium histolyticum*, *Vibrio vulnificus*, *Thermoactinomyces* sp. E21, *Alicyclobacillus sendaiensis*, *Bacillus pumilus* Col-J. Разом з тим, представлена й інформація про виробництво та очищення рекомбінантних колагеназ з використанням *Clostridium histolyticum*, *Clostridium tetani*,

Alicyclobacillus sendaiensis NTAP-1, *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B та *Bacillus cereus* [28].

З промислової точки зору, патогенність може негативно впливати на вибір мікроорганізму для проведення біосинтезу. Однак, автори огляду [29] зазначили, що приблизно 40% грибних штамів, описаних у використаній літературі, є класичними патогенами. Непатогенними видами, які характеризувались високими показниками продукування колагенолітичних ферментів, були *Rhizoctonia solani* з активністю колагенази 212,3 Од/мл і *Penicillium aurantiogriseum* з показниками активності 164-231 Од/мл.

Дослідники у роботі [30] охарактеризували колагеназу непатогенної бактерії *Lysinibacillus sphaericus* VN3, яку було виділено з ґрунту у В'єтнамі. Для синтезу позаклітиної колагенази штам вирощували в середовищі Лурія-Бертані протягом 24 годин при 37°C. Активність колагенази в супернатанті культуральної рідини становила 13500 Од. Очищений фермент з молекулярною масою приблизно 110 кДа виявляв колагенолітичну, желатинолітичну та казеїнолітичну активність.

У свою чергу, *Bacillus cereus* (штам не зазначено), що здатний до синтезу колагенази, виділили з бджолиного пилку в одному з регіонів Амазонки (Бразилія) [31]. При рН 7,8 і концентрація желатину 1,7% спостерігали найвищі значення колагенолітичної активності – $305,39 \pm 5,15$ Од. Фермент демонстрував оптимальну активність при 45 °C і рН 7,2, був стабільним у широкому діапазоні значень рН і температур (значення рН 7,2-11,0 і температури 25-50°C відповідно) та був сильно інгібований 10 мМ фенілметилсульфонілфторидом.

Стаття [32] засвідчує результати мікробного синтезу колагенази штамом *Pseudomonas* sp. Показано, що при вирощуванні штаму у середовищі М-5 (субстрат сахароза, 1%) з рН 7,5 забезпечувалась максимальна активність колагенази 0,173 Од/мл з концентрацією біомаси 2,21 мг/мл (г/л).

Маніпуляції з рекомбінантної експресії колагенази проводили автори праці [33]. Так, ген *col*, що кодує колагеназу, клонували у вектор pP43NMK і

ампліфікували в клітинах *Escherichia coli* JM109, потім проводили експресію в *B. subtilis* WB600 для одержання зазначеного ферменту. Очищена колагеназа мала активність 9405,54 Од/мг. Рекомбінантний фермент виявляв оптимальну активність при pH 9,0 і 50 °C. Каталітичну ефективність рекомбінантної колагенази пригнічували йони Fe^{3+} і Cu^{2+} , але стимулювали такі йони як Co^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} і Mg^{2+} . Встановили оптимальні умови для росту продуцента: pH 7,0 і температура 35 °C, швидкість перемішування 260 об/хв за використання 15 г/л фруктози та 36 г/л дріжджового екстракту і пептону у співвідношенні 2:1. Після оптимізації умов культивування максимальна позаклітинна активність рекомбінантної колагенази досягла 2746,7 Од/мл.

Результати експресії рекомбінантної колагенази з *Hathewayia histolytica* в штамми *Saccharomyces cerevisiae* B184M та CEN.PK 530.1C продемонстровані у роботі [34]. *E. coli* DH5 α культивували в середовищі LB при 37 °C, 250 об/хв. 100 мг/л ампіциліну додали до середовища LB для відбору плазмід. Штами дріжджів, трансформовані експресійними плазмідами, культивували при 30 °C у середовищі YPD (10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л пептону та 20 г/л глюкози). Для виробництва колагенази до середовища YPD додавали 10 мМ CaCl_2 і 0,6 мМ ZnCl_2 і дріжджові клітини культивували при 30 °C та 200 об/хв. Таким чином вдалось одержати рекомбінантні колагенази з активністю 68 Од/мл і 55 Од/мл відповідно.

Дві бактерії, що продукують колагенолітичну протеазу (колагеназу), грампозитивну *Bacillus cereus* CNA1 і грамнегативну *Klebsiella pneumoniae* CNL3, були виділені в лужних і кислих умовах відповідно. Гліцерин був джерелом вуглецю для виробництва колагенази обома штамми. Максимальна активність частково очищеної колагенази зі штамму CNA1 $23,07 \pm 0,69$ Од/мл спостерігалась при pH 7,0 і 45°C. Максимальна активність частково очищеної колагенази штамму CNL3 $5,37 \pm 0,04$ Од/мл спостерігалась при pH 6,0 і 40°C [35].

У статті [36] колагеназу отримували за допомогою штамму *Staphylococcus aureus* HN77. Оптимальні умови продукування колагенази були досягнені із

середовищем, що містило 2% крохмалю як найкраще джерело вуглецю, 2% дріжджового екстракту/пептону як джерело азоту. За температури 37 °C і рН 7 через 48 год інкубації питома активність колагенази досягла 1502,15 Од/мг.

Особливий ізолят був виявлений і візуально розпізнаний як представник роду *Didymella* під час звичайного дослідження ціломіцетів, виділених із різноманітних фруктових соків. На основі секвенування внутрішнього транскрибованого спейсера гриб було ідентифіковано як *Didymella keratinophila* AUMC 15399. Активність частково очищеного ферменту колагенази була найвищою при рН 6,0 при 35 °C при значенні 15753 ± 110 Од/мг специфічної активності ферменту. Зазначено, що найбільшим інгібітором колагенази були йони калію [37].

1.2.3. Еластаза

Еластаза належить до сімейства серинових протеїназ, які характеризуються реакційною здатністю залишку серину в активному центрі ферменту. Еластаза гідролізує еластин, специфічний білок еластичних волокон, і розщеплює інші білки, такі як гемоглобін, казеїн і фібрин. Еластаза в основному виробляється в підшлунковій залозі як неактивний попередник, проеластаза, і активується в дванадцятипалій кишці трипсином, який відщеплює невеликий пептидний ланцюг на N-кінці. Одна форма еластази має специфічність до залишків аланіну (називається еластаза 1), тоді як інша має потенційну спорідненість з об'ємною амінокислотою в положенні P1 (називається еластазою 2), і тому певним чином нагадує хімотрипсин. Еластаза також міститься в нейтрофілах. Нейтрофільна еластаза, яка бере участь у травленні бактерій, відрізняється від панкреатичної еластази, яка в основному бере участь у травленні їжі. Еластаза гідролізує нерозчинний еластин набагато ефективніше, ніж інші протеази, тому широко використовується в багатьох аспектах, таких як лікування гіперліпідемії та артеріосклерозу, а також для виробництва розчинного еластину, який можна використовувати в косметичних засобах [38].

Дослідження механізму розкладу еластину ферментом еластазою було в основному проведене з використанням очищеної панкреатичної еластази. Встановлено, що дана реакція є складним процесом, що складається щонайменше з трьох етапів. Однак механізм все ще залишається недостатньо вивченим.

Значне число дослідників виявили, що деякі грамнегативні та грампозитивні бактерії можуть виділяти еластазу, особливо грамнегативні види. Однак небагато видів бактерій придатні для промислового застосування завдяки своїй еластазній активності та патогенності. Більшість відомостей в літературі присвячені вивченню еластази, синтезованої *Pseudomonas aeruginosa*. Еластаза *P. aeruginosa* демонструє значну гомологію амінокислотної послідовності з іншими мікробними нейтральними металопротеїназами, особливо з термолізином [38].

Так, у дослідженні [38] ген, що кодує еластазу, нативно продуковану *Pseudomonas aeruginosa*, був клонований та експресований у *Escherichia coli* BL21 за допомогою системи pET-32a. Ген 1497 bp був ампліфікований і субклонований у pET-32a, а потім трансформований у *E. coli* BL21. Отриманий рекомбінантний штам при рості в середовищі LB протягом ночі показав здатність до синтезу еластази з високою активністю – 670 мкг/мл.

Авторами іншої праці вивчено особливості виділення, ідентифікації та охарактеризовано еластазу штаму *Chryseobacterium indologenes* WZE87. При культивуванні протягом 26 годин при 30 °C у середовищі з глюкозою активність очищеної еластази становила 2376,5 Од/мг, а вихід 5,8%. Молекулярна маса отриманого ензиму склала 26 кДа. Отриманий фермент був стабільним в діапазоні pH 5,0–10,5 при 37 °C. Оптимальна температура та pH становили 37 °C та 7,5 відповідно [39].

Дев'яносто один бактеріальний ізолят, що продукує еластазу, було знайдено в різних місцевостях Східної провінції Саудівської Аравії. Однак найкращим продуцентом еластази виявився штам *Priestia megaterium* gasm32.

Продуктивність синтезу еластази склала $771,3 \pm 2,0$ Од/мл за вирощування наведеного продуцента у середовищі з фруктозою [40].

У патенті [41] наведено відомості про отримання позаклітинної еластази із використанням штаму *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324. Авторами патенту було визначено основні характеристики продуцента цільового ензиму, особливості його росту. Так, оптимальна температура для росту та біосинтезу ферменту становила 25-42 °С, а оптимальне вихідне рН – 6,5, однак спостерігалось зростання рН до 8,2 в процесі росту та ферментації. Штам вирощували в середовищі з мальтозою, желатином та дріжджовим автолізатом. Активність еластази у культуральній рідині штама-продуцента *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 оптимальних умовах досягала значень 50-55 Од/мл, або 14-16 од/мг білка. Зазначено, що запропонований фермент може знайти використання у медико-технологічних процесах.

Таблиця 1.1

Загальна характеристика відомостей щодо мікробного синтезу протеолітичних ферментів

Продуцент	Субстрат	Активність ферменту, Од/мл	Умови культивування	Література
<i>Кератиназа</i>				
<i>Bacillus cereus</i> IPK35	Куряче пір'я, 0,5%	103,79	35 °С, 125 об/хв, 96 год	[8]
<i>Bacillus thuringiensis</i> MT1	Осляча шерсть, 5 г/л	422	pH 7.0, 30 °С, 200 об/хв, протягом 18 год	[10]
<i>Bacillus cereus</i> YQ15	Триптон, 10 г/л	925	36 год, 35 °С, 160 об/хв	[11]
<i>Bacillus cereus</i> L10	Куряче пір'я, 1%	9602	200 об/хв, протягом 48 год, при 37 °С	[12]
<i>Bacillus</i> sp. NFH5	Порошок курячого пір'я, 10 г/л	1879,09 ± 88,70	150 об/хв, протягом 96 год та при 30 °С	[13]
<i>Caldicoprobacter algeriensis</i> TH7C1T	Порошок курячого пір'я, 10 г/л	21000	24 год, 50 °С, pH 7,4	[14]
<i>Bacillus pumilus</i> AR57	Куряче пір'я, 1%	- (100% конверсія субстрату)	48 год, 150 об/хв, 37°С	[16]
<i>Gracilibacillus boracitolerans</i> LO15	Казеїн, 20 г/л	9000	40 год, 180 об/хв, 28°С	[17]
<i>Arthrobacter</i> sp. NFH5	Кератин і порошок пір'я (10 г/л або 1%)	26,44	24 год, 37 °С, pH 7,0, 150 об/хв	[18]
<i>Bacillus subtilis</i> S14	Порошок курячого пір'я, 15 г/л	5,5	швидкість аерації 1 об/об/хв, 400 об/хв, швидкості масопереносу кисню 24,48 год ⁻¹	[19]

Продовження таблиці 1.1

<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacillus cereus</i> (штам не наведено)	Куряче пір'я, 1%	57,66 ± 2,52 74,66 ± 1,52	37°C, 150 об/хв протягом 96 год	[20]
<i>Didymella keratinophila</i> AUMC 15399	Порошок курячого пір'я, 1 %	44903 ± 1555 Од/мг	при 30 °C і 150 об/хв протягом 15 днів	[21]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SU-1	Пір'я, 1 г/л	23,7	4 доби, рН – 7, при 37 °C	[22]
<i>Bacillus</i> sp. UPM-AAG1	Пір'я, 4,53 г/л	60,55	31,66 °C, рН - 6,87	[23]
<i>Bacillus licheniformis</i> MKU3	Триптон, 10 г/л	620	37°C, 180 об/хв, 12 год	[24]
Колагеназа				
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> VN3	Триптон, 10 г/л	13500	24 год при 37°C	[30]
<i>Bacillus cereus</i> (штам не зазначено)	Желатин, 1,7%	305,39 ± 5,15	150 об/хв, 24 год, 37°C	[31]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Сахароза, 1%	0,173	рН 7,5, 37°C, 24 год	[32]
<i>Bacillus subtilis</i> WB600	Фруктоза, 15 г/л	9405,54	рН 7,0, 35 °C, 260 об/хв	[33]

Закінчення таблиці 1.1

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> B184M	Глюкоза, 20 г/л	68	30 °С, 200 об/хв, 96 год	[34]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 530.1C		55		
<i>Bacillus cereus</i> CNA1	Желатин 1%, глюкоза 0,5%	23,07 ± 0,69	37°С, 24 год	[35]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CNL3		5,37 ± 0,04		
<i>Staphylococcus aureus</i> HN77	Крохмаль, 2%	1502,15	37 °С, рН 7, 48 год	[36]
<i>Didymella keratinophila</i> AUMC 15399	Глюкоза 0,1%, порошок курячого пір'я 1%	15753 ± 110	рН 6,0, 35 °С,	[37]
Еластаза				
<i>Escherichia coli</i> BL21	Триптон, 1%	670 мкг/мл	37 °С, 12 год	[38]
<i>Chryseobacterium indologenes</i> WZE87	Глюкоза, 0,5%	2376,5	26 годин, 30 °С	[39]
<i>Priestia megaterium</i> gasm32	Фруктоза 0,5%	771,3 ± 2,0	48 год, 37 °С, 200 об/хв	[40]
<i>Bacillus thuringiensis</i> IMB B-7324	Мальтоза 1,0 г/л; желатин 10,0 г/л	50-55	25-42 °С, рН 6,5-8,2, 18 год	[41]

Отже, проаналізувавши таблицю 1.2. можна зауважити, що для одержання кератинази науковці використовували відповідні субстрати, представлені порошком пір'я та шерстю, а також вносили сполуки білкової природи (триптон). Для мікробного синтезу колагенази підходящими субстратами були вуглеводи – сахароза, фруктоза, глюкоза, крохмаль тощо. Аналогічні субстрати були присутні в середовищах культивування продуцентів еластази. При цьому вдалось отримати ферменти мікробного походження з високими показниками активності.

1.3. Практичне використання протеолітичних ферментів

1.3.1. Фармацевтична промисловість

Значний інтерес до перспективності ферментів обумовлений важливою роллю, яку вони відіграють у біологічних процесах, зокрема в процесах травлення їжі у людини і тварин. Протеази є однією із трьох великих груп промислово важливих ферментів, що складає близько 60 % від загальносвітового продажу ензимів, які використовуються в медичній, фармацевтичній та харчовій промисловості [42].

Альтернативою одержання лікарських препаратів на основі ферментів є мікробний синтез, який має ряд переваг: дозволяє створювати препарати з максимально високою активністю та регулювати синтез окремих ферментів за допомогою компонентів поживного середовища; розширити асортимент ферментів; високі швидкості розмноження мікроорганізмів, дають можливість прискорення технологічного процесу та використання доступних і недорогих субстратів. Також застосування ферментних препаратів мікробного походження виключає можливість зараження людини зоонозами [42].

Відомо, що для терапії та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом протеолітичних та активаційних процесів, обмежено застосовується локальне внутрішньом'язове введення протеолітичних ферментів трипсинового ряду. Патент [43] присвячено способу препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення. Процес отримання цільових ензимів включає послідовну екстракцію

з біологічної сировини та фракційне осадження проферменту - трипсиногену, його активацію, ліофільну сушку, укупорку і стерилізацію. Одержання полягає в попередній інкубації розчину серинових та тіолових протеолітичних ферментів з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн при рН $6,7 \pm 2,3$ та температурі 20-37°C протягом 30-180 хвилин. Винахідники зазначають, що застосування частково деградованих форм протеолітичних ферментів знижує ймовірність побічних ефектів, збільшує час перебування препарату в кровоносному руслі та дає змогу різко зменшити разові та курсову дози препарату.

Однак більш перспективним є застосування біотехнологічних підходів для отримання таких важливих сполук як ферменти. Так, у патенті [44] висвітлено результати дослідження штаму бактерій *Bacillus* sp. BC-1 як продуцента комплексу протеолітичних ферментів. Спосіб вирощування продуцента цих ензимів у ферментері об'ємом 10 л передбачає дотримання температури 28 °C, тривалості культивування 36 годин із використанням м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) як поживного середовища. Число обертів лопастей - 220 об/хв.з піногасінням стерильною оливковою олівою та аерацією стерильним повітрям один об'єм повітря на один об'єм культуральної рідини. Культуральна рідина мала такі ферментативні властивості: час повного розрідження желатини -18 годин; протеаза нейтральна 2 од/мл, протеаза лужна 540 од/мл, протеаза кисла 4,0 од/мл.

Метою дослідження статті [42] було удосконалення біотехнології одержання протеолітичних ферментів з використанням штаму *Bacillus licheniformis*. Протеолітична активність штаму мікроорганізмів *B. licheniformis* значною мірою залежить від складу поживного середовища, температури культивування, величини рН розчину. Показано, що найбільша загальна протеолітична активність культуральної рідини відмічалась через 24 години вирощування продуцента, при значеннях рН від 8 до 9. Для представників роду *Bacillus* температура 37 °C є оптимальною для біосинтезу позаклітинних

протеаз, а оптимальним джерелом вуглецю є глюкоза, вміст якої має становити 1 % від об'єму поживного середовища.

Синтез та фізико-хімічні властивості протеолітичного комплексу *Bacillus* spp. висвітлено авторами праці [45]. Культивування бацил проводили періодичним способом протягом 48 год на качалці зі швидкістю перемішування 220 об/хв при температурі 30, 37, 42°C у середовищі Гаузе, бульйоні Хоттінгера, а також середовищі, що містило желатину та дріжджовий автолізат. Дослідні зразки вміщували один із зазначених нижче джерел вуглецю (1% до об'єму: гліцерин, мальтозу, глюкозу). Найоптимальнішим субстратом для накопичення екзопротеаз виявилась глюкоза. При вивченні залежності активності комплексного ферментного препарату *Bacillus* spp. від температури встановлено, що оптимальною температурою для гідролізу казеїну і гемоглобіну є 50°C, фібрину - 40-42°C. Повна інактивація ферменту наставала при температурі 90°C як за відсутності, так і наявності іонів кальцію. Автори підсумували, що дослідження протеолітичного комплексу *Bacillus* spp. свідчать про багатокомпонентний склад цього препарату.

На сьогодні найінтенсивніше розвивається саме медичний напрямок використання ферментних препаратів і збільшується кількість таких розробок. Багатонадійним є одержання біологічно активних полімерів медичного призначення співімобілізацією протеолітичних ферментів та антимікробних речовин з метою створення лікарських препаратів поліфункціональної дії. При цьому такі лікарські препарати набувають особливих властивостей, які пов'язані з їх полімерною природою, а саме пролонгованості дії та зменшення його токсичності. Було розроблено технологію створення медичної пов'язки з хімічно модифікованої целюлози, до якої за рахунок утворення хімічних зв'язків приєднані колагенолітичні ферменти, які входять до ферментного комплексу гепатопанкреасу краба. Ранове покриття зберігає високу терапевтичну активність [46].

Колагенолітичні ферменти мікробного походження відзначаються здатністю гідролізувати колагенові волокна різних типів. Їх можна

використовувати для повного або часткового гідролізу відповідних колагенів, зокрема для вивчення і визначення амінокислотного складу тропоколагенової молекули. Колагенолітичні ферменти мікроорганізмів можуть бути використані в медицині — для лікування деяких захворювань печінки, грижі інвертебрального диска хребта, опіків, обморожуваль, для прискорення відторгнення струпів і некротичних тканин, трофічних виразок, щоб пришвидшити очищення гнійно-некротичних нальотів. Поряд із цим колагенази необхідні для одержання і культивування клітинних культур людських і тваринних тканин. У біології клітин колагенолітичні ферменти застосовують для руйнування позаклітинного матриксу тканин з метою отримання індивідуальних клітин з культури або для вирощування культуральних клітин. Використання ферментів у косметичі відкриває можливість для створення косметичних засобів лікувально-профілактичного напрямку, які не мають побічної дії. У шкіряній промисловості колагеназу застосовують як у складі препаратів для пом'якшення голини, так і на стадії утилізації відходів виробництва [47].

Розробці ранового гідрогелевого покриття з іммобілізованою лужною протеазою *Bacillus subtilis* на основі модифікованого полі-п-вінілпіролідону присвячена стаття [48]. У дослідженні використовували внутрішньоклітинну лужну серинову протеїназу *B. subtilis* 72 виробництва ВО «Ензим» (Україна) з протеолітичною активністю 65 ОД/г ферменту. При іммобілізації відзначене кількісне включення ферменту і 100%-не збереження протеолітичної активності у діапазоні масових співвідношень ПВП: фермент 1:0,1–1:0,2. Максимум активності ферменту спостерігався через 4 год, і протягом доби вона залишається постійною, виконуючи тим самим пролонговану протеолітичну дію. Отриманий іммобілізований препарат стабільний при зберіганні в умовах низьких температур (0–4 °C) протягом 12 міс. Після γ -стерилізації отриманого препарату протеолітична активність іммобілізованого ферменту становила 60,2 % від вихідної.

1.3.2. Косметична галузь

Косметична промисловість постійно працює над розробкою інноваційних продуктів та альтернатив існуючим косметичним засобам. У сучасній косметиці спостерігається сильна тенденція до використання безпечних косметичних інгредієнтів природного походження, зокрема для уникнення негативного екологічного впливу на навколишнє середовище. Дослідження, проведене Датською радою THINK Chemicals, виявило 65 хімічних речовин, що викликають занепокоєння, у складі 39 косметичних продуктів. Виявлені хімічні речовини включали йодопропініл бутилкарбамат, який є алергеном; бутилпарабен, резорцин і етилгексилметоксициннамат, усі з яких класифікуються як ендокринні руйнівники; гліюксаль, який є мутагенним; піритіон цинку, який згідно результатів досліджень на тваринах, вважається канцерогенним, мутагенним та токсичним для людини. Таким чином, споживачі піддаються впливу цих хімічних речовин щодня. Тому в останні роки дослідники провели ретельне дослідження переваг використання речовин рослинного та мікробного походження для догляду за шкірою [49].

Так, при проведенні ензимного пілінгу використовують протеолітичні ферменти (протеази), які розщеплюють білки. Ферменти для шкіри можуть використовуватися в косметичних і терапевтичних цілях, такі активні сполуки повинні мати високий ступінь чистоти, високу специфічність, низьку антигенність і стабільність у фізіологічних умовах.

Ензимні пілінги, які також називають ензимокосметикою, є косметичними продуктами з протеолітичними ферментами, які спеціально гідролізують пептидні зв'язки білків у роговому шарі шкіри. Вони сприяють біологічному відлущуванню, прискоренню регенерації шкіри, забезпечують глибоке очищення та полегшують проникнення косметичних активних речовин. При цьому зменшується товщина рогового шару, що надає шкірі більшої пластичності. Основними рослинними ферментами, які використовуються для відлущування шкіри, є папаїн з папайї, Бромелаїн з ананаса та фікаїн з фігових дерев. Папаїн — це протеолітичний фермент,

ендопептидаза, який міститься в плодах папайї (*Carica papaya*) у концентрації близько 8%. При застосуванні на шкірі його основним призначенням є відлущування відмерлих тканин, прискорення процесу загоєння ран та опіків. Папайн має молекулярну масу 23406 Дальтон, ізoeлектричну точку 8,75 й ідеальну температуру для ферментативної активності 65 °C. Основними амінокислотами є гліцин, валін і тирозин [49].

Бромелайн - це протеаза, отримана зі стебла та плодів ананасів (*Ananas comosus*). Бромелайн являє собою суміш різних тіолових ендopeптидаз та інших компонентів, виділених зі стебла, кори та листя *Ananas comosus*. Його молекулярна маса, ізoeлектрична точка та ідеальна температура для ферментативної активності становлять 35 кДа, 10 і 37°C відповідно. Серед амінокислот переважають аланін, гліцин і аспарагінова кислота. Бромелайн в косметичній промисловості використовується для лікування акне, зморшок і сухої шкіри. Він впливає на білки мертвих клітин у верхньому шарі шкіри, в результаті чого вони замінюються більш молодими клітинами шкіри з нижніх шарів. Це також допомагає зменшити синці та набряки після ін'єкцій.

Фікаїн, також відомий як фіцин, отримують зі стебел фігового дерева (*Ficus carica*). Ця сполука проявляє ферментативну активність як чудовий ексфоліант. Також повідомляють, про антиоксидантну дію цієї речовини. Його молекулярна маса становить 24 294 Да, ізoeлектрична точка — 9,0, оптимальна температура для ферментативної активності — 50 °C. Нещодавні дослідження показали, що фіцин проявляє потенціал для розробки новітніх біокосметичних матеріалів [49].

Доступність структурної та механічної інформації щодо цих ферментів сприяла створенню нових схем класифікації. За механізмом каталізу протеази класифікуються на шість різних класів: аспарагінові, глутамінові та металопротеази, цистеїнові, серинові та треонінові протеази, хоча глутамінові протеази до сих пір не були виявлені у ссавців. Перші три класи використовують активовану молекулу води як нуклеофіл для атаки пептидного зв'язку субстрату, тоді як в решті ферментів нуклеофіл є залишком

амінокислоти (Cys, Ser або Thr відповідно), розташований в активному центрі. Протеази різних класів можуть бути додатково згруповані в родини на основі порівняння амінокислотних послідовностей, а родини можуть бути зібрані в клани на основі подібності в їхніх тривимірних структурах [50].

Таким чином, наведені відомості щодо синтезу та практичного використання ферментів класу протеаз, свідчать про те, що такі ензими наразі успішно знайшли застосування як у фармацевтичній, так і в косметичній галузі. При цьому дані щодо мікробного отримання протеолітичних ферментів засвідчують, що досліджені продуценти володіють високими показниками синтезу, тому можуть бути використані у промислових масштабах.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КЕРАТИНАЗИ

2.1. Потреба у ферментних косметичних засобах проти акне

Акне – запальне захворювання волосяних фолікулів і сальних залоз шкіри. При акне, як правило, уражаються ділянки з підвищеним вмістом сальних залоз: обличчя, груди, спина. Акне є досить поширеним захворюванням шкіри [51].

Статистичні дані указують на те, що на акне страждає:

- до 80 % населення у віці від 12 до 25 років;
- приблизно 30-40 % осіб у віці понад 25 років.

Широка розповсюдженість, значний вплив на психоемоційну сферу хворого, соціальний статус і суспільну адаптацію хворих обумовлюють актуальність даної проблеми та необхідність розробки нових ефективних засобів лікування та профілактики захворювання. Найбільш часто акне зустрічається серед підлітків у віці від 15 до 18 років, і тому захворювання має ще й іншу назву – «підліткове акне». Більш ніж в одній третині випадків акне вимагає серйозного, часом – тривалого лікування у лікарів різного фаху.

Патогенез акне складний. Серед ключових факторів розвитку цього захворювання слід вказати на:

- порушення рівня деяких гормонів;
- дисбаланс ліпідів та функції сальних залоз;
- фолікулярний гіперкератоз;
- зростання патогенності бактерій і розвиток запального процесу.

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Фофанова Є.С.			РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування кератинази	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					37	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Волосяні фолікули, потові і сальні залози шкіри людини є андроген-чутливими структурами. Під впливом андрогенів сальна залоза функціонує більш інтенсивно з підвищеним виділенням кількості шкірного сала. Частиною дослідників було відзначено, що перед появою вугрової хвороби пацієнти певний період страждали на себорею.

У хворих на акне порушуються процеси кератинізації у бік її підвищення (гіперкератозу) у гирлі волосяних фолікулів. Це призводить до закупорки корнеоцитами фолікулярного протоку і утворення мікрокомедонів. Закупорка гирла волосяного фолікула призводить до порушення дренажної функції, скупченню шкірного сала і корнеоцитів шкіри всередині фолікула, створюючи сприятливі умови для розмноження бактерій.

Основним інфекційним агентом у патогенезі акне вважається *Propionibacterium acnes*. Важливо відзначити, що цей мікроорганізм є нормальним представником шкірної мікробіоти волосяних фолікулів і сальних залоз, який далеко не завжди викликає формування акне і розвиток запального процесу.

Під час своєї життєдіяльності *P. acnes* розщеплюють шкірне сало і продукують біохімічні речовини, які мають сильні запальні властивості. Шкідливі біохімічні речовини, що продукуються *P. acnes*, пошкоджують епітелій і спричиняють розвиток патологічного запалення з формуванням пустул та мікроабсцесів [51].

Згідно літературних даних, фермент кератиназа використовується в косметичній промисловості для лікування акне, мозолів, видалення ороговілої та сухої шкіри, лікування псоріазу тощо [52].

Акне – це проблема шкіри загального характеру. Подібно до того, як кератинази можуть розріджувати відмерлі клітини, а також кератин, який блокує сальні залози, застосування кератинази у складі косметичних засобів може ефективно впливати на темп лікування акне [53].

SMART-пілінг (Розумний пілінг) – це революційна концепція пілінгу на основі кератинолітичного ферменту кератинази PB333. Унікальна біологічно

активна кератиназа діє селективно, надаючи дієвий і м'який ефект пілінгу, без порушення балансу шкіри або зменшення її природної вологості. Активним інгредієнтом цього SMART-пілінгу є кератиназа, одержана біотехнологічною ферментацією культури *Bacillus licheniformis* [54].

SMART-пілінг:

- Не викликає почервоніння, подразнень та інших побічних ефектів.
- Підходить для всіх типів шкіри, у тому числі для чутливої шкіри та шкіри з куперозом.
- Рекомендований для щотижневого чи щоденного використання
- Ідеально сумісний з вітамінами та гіалуроновою кислотою

Результати застосування SMART-пілінгу:

- ✓ Ексfolіація та усунення гіперкератозу. Кератиназа діє лише на рівні рогового шару. Завдяки специфічній кератолітичній активності кератиназа дбайливо та без травматичних наслідків відлущує ороговілі клітини шкіри, зумовлюючи ефект делікатного пілінгу. При цьому значення рН не змінюється.
- ✓ Клітинне оновлення та тривале зволоження. Завдяки ексfolіюючому ефекту SMART-пілінг вирівнює мікрорельєф шкіри, стимулює природне оновлення клітин, тим самим надаючи шкірі підтягнутий і свіжий вигляд. Забезпечує інтенсивну тривалу гідратацію рогового шару шляхом зміни сили зчеплення корнеоцитів. Шкіра вирівнюється і розгладжується, набуває рівного, сяючого, здорового вигляду.
- ✓ Освітлення та вирівнювання тону. Поверхневі клітини схильні до пігментації у зв'язку з окисненням, УФ-випромінюванням і старінням клітин. Усунення цих клітин передбачає зменшення поверхневих плям, вирівнювання тону шкіри.
- ✓ Підвищення проникності рогового шару. Останні дослідження в галузі біохімії довели, що кератиназа підвищує проникність

рогового шару шкіри у 4 рази, що забезпечує «адресну доставку» у глибокі шари шкіри інших діючих речовин [54].

Отже, запропоновано використання кератинази у складі ензимного пілінгу для боротьби з постакне та акне у період ремісії.

Висипання переважно з'являються у віці 12-16 років і зберігаються впродовж періоду статевого дозрівання. Разом з тим, понад 50% жінок віком 20-30 років страждають від акне [55].

Станом на 1 січня 2022 року в Україні чисельність жінок у віці 15-29 років склала 3077285 чол.

Приймаємо, що будемо забезпечувати жінок вікової категорії 15-29 років, що проживають у Київській області, тоді згідно статистичних даних їх чисельність складає 134000 [56].

Якщо у косметичному сегменті вже представлені пілінги на основі протеолітичних ферментів, то оберемо в якості цільової групи 20% від загальної чисельності жінок Київської області – 26 800 жінок.

Приймаємо, що для 1 застосування необхідно 5 г пілінгу, що є достатнім для нанесення на обличчя та шию.

Тоді для проведення 1 процедури для 26 800 жінок необхідна така кількість пілінгу:

$$5 \times 26\,800 = 134\,000 \text{ г} = 134 \text{ кг}$$

Косметологи радять проводити курс поверхневих пілінгів 4-8 процедур з інтервалом 14-21 день, оскільки при застосуванні за такою схемою пілінг здатний згладити і освітлити явища постакне без побічної подразнювальної дії та провокування нових висипань [57].

Однак виробники ензимного пілінгу, що містить протеолітичний фермент, рекомендують такий режим використання пілінгу – один раз на 7-10 дні або курсом 10-14 днів щодня, перерва на 2-3 місяці і повторне застосування курсу [58].

Припустимо, що будемо рекомендувати застосовувати анти-акне пілінг з кератиназою протягом 14 днів з перервою на 2,5 місяці та повторним курсом

застосування пілінгу, тоді загальна кількість днів використання пілінгу на рік становитиме:

$$14+14+14+14 = 56 \text{ днів}$$

Отже, для забезпечення річної потреби 26 800 жінок пілінгом з кератиназою курсом 56 днів необхідно продукту:

$$134 \times 56 = 7\,504 \text{ кг}$$

Інформаційні джерела засвідчують, що відсоток вводу кератинази до косметичного засобу складає близько 2% [59].

Тоді у складі 7 504 кг пілінгу міститься кератинази:

$$7\,504 \text{ кг} - 100 \%$$

$$X \text{ кг} - 2\%$$

$$X = \frac{7\,504 \times 2}{100} = 150,1 \text{ кг}$$

Таким чином, річна потреба в кератиназі для застосування у складі пілінгу проти акне складає 150,1 кг.

2.2. Розрахунок річної потужності виробництва

Оскільки у статті [12] відсутні відомості щодо концентрацій синтезованої кератинази, приймемо концентрацію синтезованого ферменту 3 г/л за 7 діб (168 год) культивування.

Розрахуємо кількість культуральної рідини, потрібний для отримання 150,1 кг кератинази:

$$3 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$150\,100 \text{ г} - X \text{ л}$$

$$X = \frac{150\,100}{3} = 50\,033 \text{ л}$$

Врахуємо 20% втрат кератинази при виділенні та очищенні:

$$V_{\text{кр}} = 50\,033 \times 1,2 = 60\,039,6 \text{ л}$$

2.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

З метою покриття річної потреби у ферменті кератиназі у складі пілінгу проти акне (за п.1.2) з урахуванням 20% втрат продукту при виділенні та очищенні слід напрацювати 60 039,6 л культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації для подальшого обрахунку кількості стадій приготування інокуляту [60]. Приймаємо кількість трудоднів – 300, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 60\,039,6/300 = 200,1 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_d \times T_{цф})/24 = (1,1 \times 200,1 \times 174)/24 \approx 1600 \text{ л/цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год.

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{г} = V_{цк}/K_{зап} = 1\,600/0,6 \approx 3 \text{ м}^3,$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 1\,600/3000 = 0,53 - \text{не перевищує заданого значення [60].}$$

2.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 3 м³

За один виробничий цикл отримують 1 600 л культуральної рідини (згідно п.1.3). При одержанні культуральної рідини слід врахувати втрати при краплевиносі через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять орієнтовно 10 - 15%.

З урахуванням 10% втрат загальна кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{роб.1} = V_{кр} \times (1 + E_{ф}) = 1600 \times 1,1 = 1\,760 \text{ л},$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 1 760 л. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера становить: $V_{\phi} = 1\,760/0,6 = 2\,933$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст1} = 3\,000$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з1} = 1\,760/3\,000 = 0,58$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{роб.1} = 1\,760$ л середовища необхідно приготувати

$$V_{пм1} = V_{роб.1} \times X_{\phi} = 1\,760 \times 0,1 = 176 \text{ л посівного матеріалу,}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 1\,760 - 176 = 1\,584 \text{ л,}$$

Врахуємо, що під час вирощування 176 л інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} \times (1+E_{\phi}) = 176 \times 1,1 \approx 193 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 193 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 193/0,6 = 322$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{ст2} = 300$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з2} = 193/300 = 0,64$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{роб.2} = 193$ л необхідно приготувати

$$V_{пм2} = V_{роб.2} \times X_{\phi} = 193 \times 0,1 = 19,3 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 193 - 19,3 = 173,7 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 19,3 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок крапливину через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 19,3 \times 1,1 = 21,2 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 21,2 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па3}} = 21,2 / 0,6 = 35 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом апарат $V_{\text{ст3}} = 35 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 21,2 / 35 = 0,60$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 21,2 л необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} \times X_{\text{ф}} = 21,2 \times 0,1 = 2,1 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм3}} = 2,1 \text{ л}$ (2100 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням біологічного агента у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ з коефіцієнтом заповнення $K_{3\text{к}} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} \times K_{3\text{к}}) = 2100 / (750 \times 0,2) = 14 \text{ колб}$$

Отже, для отримання посівного матеріалу з метою забезпечення біосинтезу кератинази *Bacillus cereus* L10 встановлюють ферментер на 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6, інокулятори 300 л та 35 л відповідно, а також здійснюють підготовку 14 качалочних колб об'ємом 750 мл.

Таблиця 2.1

Розрахунки щодо підготовки посівного матеріалу та виробничого
біосинтезу кератинази *Bacillus cereus* L10

№ стадії	Тип апарата	Геометричний об'єм апарата V_r , л	Коефіцієнт заповнення, K_z , частка	Робочий об'єм апарата $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л	Найближчий об'єм апарата, л
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Колби, шт	14,0 шт	0,2	2100 мл	1 890	210 мл	0,75
2.	Інокулятор 2	35	0,60	21,2	19,1	2,1	35
3.	Інокулятор 1	300	0,64	193	173,7	19,3	322
4.	Ферментер	3000	0,58	1760	1584	176	2 933

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ЕТАПІВ ВИРОБНИЦТВА КЕРАТИНАЗИ

Стаття [61] висвітлює технологію виділення та очищення кератинази після культивування *Bacillus licheniformis* dcs1. Дана технологія включає проведення таких стадій:

1. Фільтрування через фільтрувальний папір та центрифугування при 7000 об/хв протягом 6 хв.
2. Ультрафільтрація при значенні молекулярно-масового відсікання 10 000 Да. При цьому супернатант було сконцентровано на 50%.
3. Неочищений фермент у формі концентрату додавали до колонки з карбоксиметилцелюлозою.

Спочатку колонку розміром 15x2 см врівноважували 25 мМ калій-фосфатним буфером А з рН 5,8. Кератиназовмісний розчин з 32,3 мг/мл білка завантажували на колонку та елюювали буфером А. Абсорбцію елюйованих білків проводили при значенні поглинання елюату 280 нм (A_{280}). Коли показники A_{280} демонстрували безперервну базову лінію, виконували друге елюювання, використовуючи 25 мМ калій-фосфатний буфер, рН 6,2, 20 мМ NaCl – буфер В. Після отримання безперервної базової лінії знову на A_{280} , елюювання виконували 25 мМ калій-фосфатним буфером, рН 6,8, 20 мМ NaCl – буфер С, зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв.

Активні фракції об'єднували разом і діалізували буфером С.

4. Кератиназу додатково очищали за допомогою колонки Sephadex G-75 15x2 см і завантажували кількість білка 10 мг/мл. Врівноваження та елюювання проводили з використанням 50 мМ калій-фосфатного буфера рН 7,0 при швидкості потоку 0,5 мл/хв. Збирали фракції об'ємом 1 мл і з використанням методу A_{280} проводили елюювання білка кожної фракції [61].

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування післяферментаційних етапів виробництва кератинази	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Фофанова Є.С.						
Перевір.		Стабніков В.П.					46	11
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Цю технологію можна взяти за основу та адаптувати до виробничих умов. Розглянемо та обґрунтуємо стадії отримання ферменту кератинази.

3.1. Відділення біомаси від культуральної рідини

Основними методами відділення біомаси від культуральної рідини є седиментація (сепарування, центрифугування, відстоювання) та фільтрація [62].

Фільтрування. Фільтрування — це процес, у якому тверда і рідка фази відокремлюються під час проходження суспензії через пористу плівку - фільтр.

Сучасні методи фільтрації включають мембранні процеси, які дозволяють відділяти не тільки тверді частинки, а й розчинені речовини, утворюючи концентрати та пермеати. У виробництвах, де основним продуктом є метаболіт, розчинений у культуральній рідині, для виділення клітин біомаси найчастіше застосовують фільтрацію.

Для підвищення продуктивності фільтраційного обладнання та зменшення витрат ручної праці дедалі частіше використовують фільтри з автоматизованим зніманням осаду, наприклад, барабанні вакуум-фільтри. У процесі фільтрації під дією розрідження всередині барабана культуральна рідина проходить через фільтрувальну тканину. Фільтрат збирається у спеціальний резервуар, тоді як осад залишається на зовнішній поверхні тканини.

Після проходження зон підсушування, промивання та повторного підсушування осад видаляється ножом, розташованим на визначеній відстані від барабана. Це забезпечує стабільну товщину осаду в зоні фільтрації, що дозволяє вести процес у безперервному режимі з постійною швидкістю.

Однак, при роботі з деякими культуральними рідинами, наприклад, з культуральною рідиною актиноміцетів, драглистий осад характеризується високим питомим опором. Навіть тонкий шар осаду, який залишається після зрізання ножом, суттєво знижує швидкість фільтрації [62].

Центрифугування є процесом розділення неоднорідних рідких систем під впливом відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості цей метод широко застосовується для поділу суспензій на рідку і тверду фази, що

включають мікроорганізми, ферменти, амінокислоти та інші біосинтезовані продукти кристалічної або аморфної структури. Центрифуги використовують у таких ситуаціях [62]:

- коли осад погано фільтрується;
- коли необхідно отримати звільнену від допоміжних фільтрувальних матеріалів біомасу;
- у випадку необхідності забезпечення безперервності процесу при високій стерильності.

Основною перевагою центрифуг є висока продуктивність та компактність обладнання. Завдяки значно більшій рушійній силі, що створюється під час обертання ротора разом із суспензією або емульсією, швидкість розділення сумішей у центрифугах значно перевищує аналогічні показники у фільтрах та відстійниках.

Розділення в сепараторах. Один із найбільш поширених типів центрифуг, що використовуються в мікробіологічній промисловості, — це сепаратори. Вони знаходять широке застосування у виробництві:

- моноклональних антитіл (mAb),
- біомаси *Escherichia coli*,
- інсуліну,
- вакцин для медицини та ветеринарії,
- заквасочних культур і пробіотиків,
- продуктів для фракціонування плазми крові,
- екстра- та внутрішньоклітинних ферментів,
- нутрицевтиків,
- терапевтичних білків,
- у процесах екстракції.

Сепаратори використовуються, зокрема, для поетапного відокремлення грубодисперсного осаду від тонкодисперсних суспензій. Це дозволяє виконувати дві або більше операцій із переробки рідких сумішей в одному процесі.

Тривалість робочого циклу сепарації визначається концентрацією завислих частинок у вихідному продукті та продуктивністю сепаратора для цього продукту. Сепаратори з періодичним відцентровим вивантаженням осаду ефективно застосовуються для обробки продуктів, тверда фаза яких не має тенденції до значного ущільнення під впливом інтенсивного поля відцентрових сил.

Суттєвим недоліком сепараторів є швидка забиваність мундштуків і міжтарільчатого простору механічними частками та мертвими клітинами [62].

Таким чином, спираючись на розглянуті характеристики поширених у промисловості методів розділення культуральної рідини та біомаси, а також враховуючи дані статті, яку було обрано за основу при підборі технології виділення кератинази, зупинимось на центрифугуванні культуральної рідини після біосинтезу ферменту. Центрифугування будемо проводити при 7000 об/хв протягом 10 хв.

3.2. Ультрафільтрація

Звичайна фільтрація застосовується для відокремлення великих частинок твердої фази від рідини (діаметром 50-100 мкм і більше). Для виділення дрібніших частинок (діаметром 2-5 мкм) або для розділення розчинів використовуються мембранні методи, такі як мікрофільтрація, діаліз, електродіаліз, зворотний осмос і ультрафільтрація. Усі ці методи передбачають використання напівпроникних мембран.

Переваги мембранних методів для розділення біологічних суспензій і розчинів включають: відсутність впливу температури, механічних або хімічних факторів на оброблюваний продукт, простоту апаратурного оформлення без рухомих частин, низьку енергоємність процесу та можливість забезпечення герметичності і асептики під час роботи [62].

Ультрафільтрація — це процес очищення та концентрації розчинів високомолекулярних сполук (наприклад, ензимів), який одночасно забезпечує їх очищення від низькомолекулярних домішок шляхом пропускання розчину через мембрану з порами діаметром від 0,01 до 0,1 мкм.

Ультрафільтрація використовується для концентрації розчинених високомолекулярних сполук. Зазвичай вважається, що молекулярна маса розчиненої речовини повинна бути більше 500, при цьому молекулярна маса молекул розчинника має бути значно меншою за молекулярну масу розчиненої речовини.

На відміну від мікрофільтрації та звичайної фільтрації, при ультрафільтрації затримуються окремі молекули високомолекулярних розчинених речовин. Ультрафільтрація не полягає в розділенні фаз, а в перерозподілі розчинених речовин у рідкій фазі [62].

Отже, як засвідчує стаття [61] після центрифугування приймаємо проведення ультрафільтрації супернатанту, що містить кератиназу, при значенні молекулярно-масового відсікання 10 000 Да. При цьому супернатант концентрується на 50%.

3.3. Адсорбція кератинази

Неочищений фермент у формі концентрату додавали до колонки з карбоксиметилцелюлозою [61].

Ферменти та інші білки мають здатність адсорбуватися на різних нерозчинних речовинах. Цю властивість використовують для розділення сумішей білків і очищення ферментів, особливо в лабораторній практиці, для отримання високоочищених та гомогенних ензимів [63].

Найважливішими адсорбентами для білків є різні іонообмінники, такі як гелі фосфату кальцію, гелі гідроксиду алюмінію, а також різноманітні афінні адсорбенти, що створюються для конкретних видів ензимів. Незалежно від механізму розділення білків — адсорбції, іонного обміну або вибіркової спорідненості до іммобілізованих на носії лігандів — техніка розділення та очищення ензимів зазвичай залишається однаковою. Розчин, що містить цільовий ензим, наноситься на колонку, попередньо урівноважену розчинником. Потім через колонку пропускають буфер певного складу. Елюат, що виходить із колонки, збирається по фракціях, які використовуються як початковий матеріал для отримання відповідного ензиму.

У іонообмінниках білки зв'язуються завдяки електростатичним силам, які виникають між зарядженими поверхнями білків і щільними кластерами заряджених груп самого іонообмінника. Типові іонообмінники, такі як диметиламіноетилцелюлоза та карбоксиметилцелюлоза, в набряклому стані мають ступінь модифікації до 0,5 ммоль/см³, що відповідає 0,5 М концентрації заряджених груп. Ці заряди в колонці нейтралізуються іонами протилежного знака (іони металів, іони хлору, буферні розчини тощо). Після адсорбції необхідного білка на колонці проводиться його елюція [63].

Автори статті [61] врівноважували колонку 25 мМ калій-фосфатним буфером А з рН 5,8, потім завантажували кератиназовмісний розчин на колонку та елюювали буфером А. Абсорбцію елюйованих білків проводили при значенні поглинання елюату 280 нм (A_{280}). Коли показники A_{280} демонстрували безперервну базову лінію, виконували друге елюювання, використовуючи 25 мМ калій-фосфатний буфер, рН 6,2, 20 мМ NaCl – буфер В. Після отримання безперервної базової лінії знову на A_{280} , елюювання виконували 25 мМ калій-фосфатним буфером, рН 6,8, 20 мМ NaCl – буфер С, зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв.

Так, будемо проводити адсорбцію кератинази як описано вище з використанням колонки з карбоксиметилцелюлозою.

3.4. Очищення кератинази

Після адсорбції активні фракції об'єднували разом і діалізували буфером С [61].

Діаліз — це трансмембранний процес, за допомогою якого різні розчинені речовини з різними молекулярними масами можуть бути розділені шляхом дифузії через напівпроникну мембрану. З одного боку мембрани знаходиться вихідний розчин, з якого видаляються деякі складові. Розчин, в який переноситься частина складових вихідного розчину, називається діалізатом. Рушійною силою процесу є градієнт концентрації, який сприяє дифузії розчиненої речовини з вихідного розчину через мембрану в діалізат.

Розділення речовин досягається завдяки різниці в швидкостях їх перенесення через мембрану [64].

При проведенні процесу діалізу використовують непористі мембрани. Для того, щоб швидкість дифузії речовини в мембрані була достатньо великою, необхідно застосовувати мембрани, які можуть сильно набухати. Відомо, що внаслідок набухання мембрани коефіцієнт дифузії низькомолекулярної речовини може збільшитися на кілька порядків. Селективність розділення досягається в основному завдяки відмінності молекулярних мас складових розчину. Коефіцієнти дифузії речовин зменшуються при збільшенні молекулярної маси.

Але процес діалізу не здобув такого широкого промислового застосування, як процеси ультрафільтрації, зворотного осмосу або електродіаліз. Це зумовлено тим, що при цих процесах зазвичай можна отримати більші потоки речовин, оскільки вони проходять під дією зовнішньої рушійної сили (градієнт тиску або градієнт електричного потенціалу) [64].

Тому слід розглянути інші способи мембранного очищення.

Суть *електродіалізу* полягає в тому, що перенесення іонів через мембрану інтенсифікується за допомогою постійного електричного поля. Однак електродіаліз непридатний для очищення металоферментів, оскільки під час цього процесу ензими можуть втрачати активність [65].

Баромембранні способи розділення рідких сумішей відрізняються від звичайного фільтрування, яке дозволяє розділяти лише суспензії, тобто відокремлювати тверду фазу від рідкої. Баромембранні способи, завдяки використанню напівпроникних мембран, дозволяють розділяти істинні розчини на окремі компоненти, а рушійною силою цього процесу є різниця тисків.

Прямий осмос — це процес, за якого молекули розчинника дифундують через напівпроникну мембрану в розчин певної речовини, при цьому мембрана не пропускає розчинену речовину. Осмотичний тиск розчину P_o визначається молярною концентрацією розчиненої речовини та ступенем її дисоціації. Якщо

P_o більше гідравлічного тиску (P_r), то проходить прямий осмос, а коли $P_o = P_r$, то припиняється дифузія води через мембрану.

Коли P_r більший за P_o , молекули розчиненої речовини і води проходять через мембрану в розчинник. Такий механізм спостерігається при зворотному осмосі та ультрафільтрації. Суть цих процесів полягає в перенесенні молекул через мембрану під тиском, що перевищує осмотичний. При цьому розчинена речовина, залежно від її молекулярної маси та розмірів пор мембрани, частково чи повністю затримується.

Однак між зворотним осмосом і ультрафільтрацією є відмінності. При зворотному осмосі розділення низькомолекулярних речовин відбувається під тиском від 0,7 до 14 МПа, адже розмір пор мембран у цьому процесі є дуже малим — від $1 \cdot 10^{-4}$ до $2 \cdot 10^{-3}$ мкм.

Ультрафільтрація зберігає ферментативну активність та вимагає мінімальних витрат енергетичних ресурсів.

Основним робочим елементом ультрафільтраційних систем є мембрани, до яких висуваються такі ключові вимоги: висока пропускна здатність та вибірковість, доступність за ціною, стійкість до мікробного та термічного впливів, відсутність фізичної адсорбції білкових молекул на мембрані, а також відсутність негативного впливу мембрани на ферментний комплекс і стабільність її характеристик протягом експлуатації [65].

Зважаючи на зазначену інформацію, після адсорбції будемо проводити ультрафільтрацію.

3.5. Висушування кератинази

Після операцій виділення та хімічного очищення ферменту, наступним кроком є його висушування — видалення вільної і зв'язаної води з препарату. Оскільки ферменти, як правило, чутливі до температури, для їх висушування слід застосовувати такі методи, які не порушують їх біологічну активність [66].

На сучасному етапі промислового виробництва ферментів застосовуються різноманітні методи зневоднення препаратів. Одним із найбільш поширених є ліофільне сушіння, яке проводиться при відносно низьких температурах (від -

10 до -15°C). Для обробки великих об'ємів розчинів, що містять ферменти, часто використовують розпилювальні сушарки для висушування [66].

Вакуум-сушильні шафи, подібно до сублімаційних сушарок, призначені для висушування термолабільних продуктів. Однак процес сушіння у вакуум-сушильних шафах відбувається при кімнатній або підвищеній температурі, яку може витримувати оброблюваний матеріал.

Сушіння в вакуум-сушильних шафах відбувається періодично. Для цього вологий матеріал розміщують на полицях шафи, створюють вакуум, а потім розпочинають обігрівання за допомогою пари, що надходить через порожнини в плитах, або за допомогою електричного струму. Процес завершується, коли матеріал досягає потрібного рівня залишкової вологості, а далі сухий матеріал вивантажують [62].

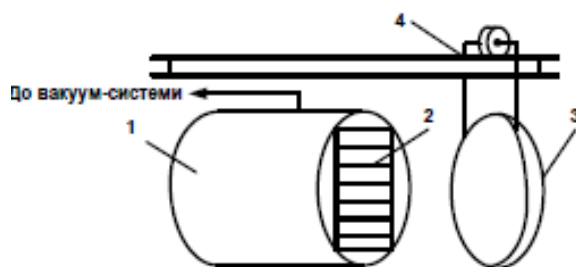


Рис. 3.1. Спрощена схема вакуум-сушильної шафи.

Такі сушарки призначені для висушування невеликих обсягів вологого матеріалу.

Сушіння сублімацією, або ліофільне висушування, є одним з найефективніших методів зневоднення живої біомаси, таких як дріжджі, бактерійні препарати та інші термолабільні біологічні об'єкти. При температурі 0°C колоїдна система, до складу якої входить волога, замерзає, і далі відбувається процес сублімації — випаровування твердої речовини без її плавлення, тобто вода переходить із твердого стану в пароподібний, минаючи рідку фазу. Цей метод дозволяє зберегти молекулярну структуру матеріалу майже без змін, а висушений матеріал характеризується високою дисперсністю та пористістю. На відміну від звичайного сушіння, яке призводить до значного

зменшення об'єму матеріалу, ліофільне сушіння зберігає його початкові властивості.

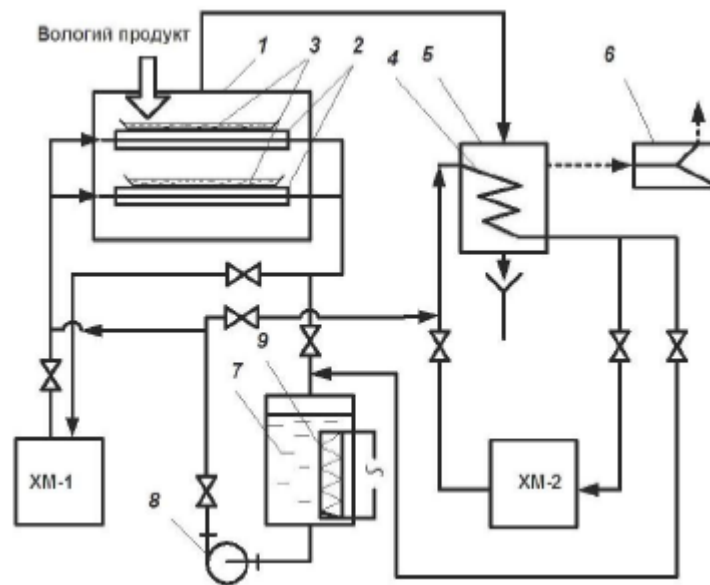


Рис. 3.2. Схема вакуум-сублімаційної сушарки періодичної дії.

Камеру герметизують і вмикають холодильну машину ХМ-1, яка прокачує холодоносій через плити 2, перетворюючи розчин на льодовий шар. Розсіл від цієї машини направляється у змійовик, занурений в рідину в ємності 7 (на схемі лінії сполучення і змійовик не показано), для охолодження розсолу до необхідної температури, що повинна бути вище температури сублімації. Сублімаційну камеру з'єднують з конденсатором 5, в якому розташований змійовик або інший теплообмінний пристрій з великою поверхнею 4. Розсіл від холодильного агрегату ХМ-2 подається в змійовик з температурою, нижчою за температуру замороженого матеріалу і температури сублімації. Після цього вмикається вакуум-насос 6, і в конденсаторі 5 та сублімаційній камері 1 створюється глибокий вакуум (15-150 Па).

Розсіл з ємності 7 насосом 8 починають прокачувати через плити. Оскільки температура розсолу вище температури замороженого матеріалу, він передає тепло матеріалу, що необхідне для сублімації льоду, при цьому температура льоду не змінюється. Охолоджений розсіл повертається в ємність 7, де його підігрівають за допомогою трубчастих електронагрівачів 9. Водяна пара, що утворюється в субліматорі, направляється в конденсатор 5. Оскільки

температура в конденсаторі нижча, ніж у субліматорі, водяна пара конденсується на поверхні теплообмінного пристрою 4, утворюючи шар льоду.

Після завершення процесу сушіння температуру розсолу, що циркулює через ємність 7, підвищують, щоб довести температуру висушеного матеріалу до кімнатної або трохи вище. Потім вимикають вакуум-насос і холодильну машину ХМ-2. Апаратуру повністю з'єднують з атмосферою через змійовик 4, і за допомогою насоса 8 прокачують теплий розсіл, щоб розтопити шар льоду на поверхні змійовика 4. Воду з конденсатора зливають в каналізацію. Після цього висушений матеріал вивантажують із сублімаційної камери, і установку готують до наступного технологічного циклу [62].

Отже, для висушування кератинази обираємо сублімаційну сушарку.

Після цього субстанцію ферменту подрібнюють, просіюють та направляють на фасування та пакування.

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

- а. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 1600 \text{ л} = 1,6 \text{ м}^3$;
- б. концентрація цільового продукту у КР $C_{ант} = 3,0 \text{ г/л} (=3,0 \text{ кг/м}^3)$
- с. концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 0,8 \text{ г/л} (= 0,8 \text{ кг/м}^3)$ – АСБ [67]
- д. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 20% (прийнято для розрахунку ТЕО):

1) початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає
 $1,6 \text{ м}^3 \times 3,0 \text{ кг/м}^3 = 4,8 \text{ кг}$;

2) кінцева кількість (з урахуванням 20% втрат) має становити 3,84 кг

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 4.1.

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Фофанова С.С.						
Перевір.		Стабніков В.П.					57	4
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 4.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/ п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потoki на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Підготовка культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	1,6 м ³ (1600 л)	-	1,6 м ³ (1600 л)	Збірник КР 2 м ³
Відділення біомаси від культуральної рідини						
2	Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	1,28 кг (1,6×0,8)- АСБ, з урахуванням 90% вологості 12,8 кг	-	12,8 кг	Промислова центрифуга, продуктивність – 2000 л/год
		Супернатант	1 587,2 л (1600-12,8)	79,36 л (5%)	1 507,84 л	Збірник супернатанту об'ємом 2 м ³
Ультрафільтрація						
3	Ультрафільтрація супернатанту	Супернатант	1 507,84 л	-	-	Ультрафільтраційна установка зі значенням молекулярно-масового відсікання 10 000 Да

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4	5	6	7
		Концентрат	753,92 л	37,7 л (5%)	716,22 л	- (подається відразу на адсорбцію)
		Пермеат	-	-	753,92 л (1 507,84 - 753,92)	- (на утилізацію)
	Адсорбція					
4	Адсорбція кератинази	Концентрат	753,92 л	-	-	Колонка з карбоксиметил- целюлозою
		Елюат кератинази	376,96 кг	18,8 кг (5%)	358,16кг	
Очищення кератинази						
5	Ультрафільтрація елюату кератинази	Елюат кератинази	358,16 кг	-	-	Ультрафільтраційна установка зі значенням молекулярно-масового відсікання 10 000 Да
		Концентрат	107,4 кг (30%)	-	-	- (подається відразу на сушіння)
		Пермеат	-	-	250,76 (358,16- 107,4) кг	- (на утилізацію)

Закінчення таблиці 4.1

1	2	3	4	5	6	7
	Висушування кератинази					
6	Сушіння кератинази сублімацією	Концентрат (вологість близько 95%)	107,4 кг	-	-	Сублімаційна сушарка
		Висушена кератиназа (вологість 3,5%)	4,03 кг	0,19 кг (5%)	3,84 кг (4,03-0,19)	Збірник об'ємом 5 л (передають на фасування та пакування)

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ КЕРАТИНАЗИ

Таблиця 5.1.

Специфікація обладнання для виділення та очищення кератинази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
3-1 3-4	Збірник 2 м ³	2	Реактор Genio об'ємом 2000 л з нержавіючої сталі. Має внутрішній діаметр приблизно 1200 мм, висота резервуара 2100 мм. Має зовнішній кожух із нержавіючої сталі, розрахований на розрахунковий тиск приблизно 3 бар. Компанія: «GENIO» (Польща) [68]
H-2 H-5 H-8	Насос	3	Відцентровий насос FL31CI. Максимальний натиск: 24 м. Максимальний тиск: 2,3 бар. Максимальна температура: +120 °C. Робоче колесо відкрите. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316. Максимальна продуктивність 25 м ³ /год. Компанія: «Emerget» (Україна) [69]
Ц-3	Центрифуга	1	Промислова центрифуга Peony, продуктивність – 2000 л/год. Швидкість обертання барабану – 6250 об/хв. Час запуску – менше 8 хв. Компанія: «ZHANGJIAGANG CITY PEONY MACHINERY CO.,LTD» (Китай) [70]
УФ-6 УФ-9	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна система для концентрації фермента SS-UE010-8040. Значення молекулярно-масового відсікання 10 000 Да. Матеріал мембрани – поліетерсульфон (PES). Компанія: «RisingSun Membrane Technology (Beijing) Co., Ltd.» (Китай) [71]
ІК-7	Іонообмінна колонка	1	Іонообмінна колонка Whatman CM52 з карбоксиметилцелюлозою. Розміри 3,2 см x 100 см. Компанія: «Whatman» (Великобританія) [72]

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Фофанова Є.С.				РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання для одержання кератинази	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Стабніков В.П.						61	2
Реценз.						Кафедра БТМ ⁴		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Закінчення таблиці 5.1

СС-10	Сублімаційна сушарка	1	Ліофілізаційна сушарка LYOPRO-5.0. Продуктивність сушіння 100 л/год. Площа сушіння 5,40 м ² . Максимальний вакуум $\leq 1,0$ Па. Максимальна температура охолодження полиці -55 °С. Кінцева температура охолодження конденсатора -75 °С. Компанія: «Zhejiang Lyomac Pharmaceutical Equipment Co., Ltd.» (Китай) [73]
З-11	Збірник 5 л	1	Реактор об'ємом 5 л з нержавіючої сталі. Габаритні розміри: 450*480*1500 мм. Компанія: «Zhengzhou Xianglu Machinery Co., Ltd.» (Китай) [74]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ КЕРАТИНАЗИ

Технологічна схема виділення та очищення кератинази після культивування *Bacillus cereus* L10 включає проведення таких стадій: центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація супернатанту, адсорбція кератинази, ультрафільтрація елюату кератинази та сушіння кератинази сублімацією.

ТП 1. Підготовка культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину після виробничого біосинтезу насосом перекачують до збірника 3-1 обсягом 2 м³. У даному збірнику культуральна рідина зберігається за температури 25 ±1 °С до подальших стадій виділення та очищення ферменту кератинази.

ТП 2. Відділення біомаси від культуральної рідини

ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

За допомогою насоса Н-2 культуральну рідину зі збірника 3-1 (від ТП 1.1) подають на промислову центрифугу Ц-3. Центрифугування проводять при 7000 об/хв протягом 10 хв.

Отриманий супернатант подають до збірника 3-4 об'ємом 2 м³.

ТП 3. Ультрафільтрація

ТП 3.1. Ультрафільтрація супернатанту

Супернатант, що містить кератиназу (від ТП 2.1), за допомогою насоса Н-5 зі збірника 3-4 об'ємом 2 м³ перекачують на ультрафільтраційну установку УФ-6, матеріал мембрани – поліефірсульфону (PES). Значення молекулярно-масового відсікання 10 000 Да. Ступінь концентрування супернатанту – 50%.

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми отримання субстанції кератинази	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Фофанова Є.С.						
Перевір.		Стабніков В.П.					63	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Пермеат поступає на утилізацію. Одержаний концентрат кератинази з УФ-6 вивантажують у підкатну ємність та передають на адсорбцію.

ТП 4. Адсорбція

ТП 4.1. Адсорбція кератинази

Після ультрафільтрації (від ТП 3.1) концентрат кератинази надходить на іонообмінну колонку ІК-7.

Колонку ІК-7 з карбоксиметилцелюлозою врівноважують 25 мМ калій-фосфатним буфером А з рН 5,8, потім завантажують кератиназовмісний концентрат на колонку та здійснюють елюювання буфером А. Абсорбцію елюйованих білків проводять при значенні поглинання елюату 280 нм (A_{280}).

Коли показники A_{280} демонструють безперервну базову лінію, виконують друге елюювання, використовуючи 25 мМ калій-фосфатний буфер, рН 6,2, 20 мМ NaCl – буфер В. Після отримання безперервної базової лінії знову на A_{280} , виконують елюювання 25 мМ калій-фосфатним буфером, рН 6,8, 20 мМ NaCl – буфер С, зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв.

Одержані активні фракції об'єднують та передають на подальшу стадію очищення.

ТП 5. Очищення кератинази

ТП 5.1. Ультрафільтрація елюату кератинази

Елюат кератинази (від ТП 4.1) передають на ультрафільтраційну установку УФ-9, матеріал мембрани – полієфірсульфон (PES). Значення молекулярно-масового відсікання 10 000 Да. Ступінь концентрування елюату – 30%.

Пермеат поступає на утилізацію. Одержаний очищений концентрат кератинази з УФ-9 вивантажують у підкатну ємність та передають на стадію висушування.

ТП 6. Висушування кератинази

ТП 6.1. Сушіння кератинази сублімацією

Очищений концентрат кератинази (від ТП 5.1) подають на сублімаційну сушарку СС-10. Площа сушіння 5,40 м². Максимальний вакуум $\leq 1,0$ Па.

Висушування проводять протягом 24-37 годин [75].

Температура ліофільного сушіння становить від -10 до -15 °C [75].

Кінцева вологість висушеної субстанції кератинази становить близько 3,5%.

По закінченню процесу висушену субстанцію кератинази вивантажують з СС-10 та подають до збірника 3-11 об'ємом 5 л для зберігання. Після цього субстанцію фермента передають на фасування та пакування.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ КЕРАТИНАЗИ

1) Опис

Сипучий порошок від білого до світло-жовтого кольору.



Рис. 7.1. Зовнішній вигляд субстанції кератинази [76].

2) Активність кератинази

Кератинолітичну активність визначають з використанням казеїну як стандартного субстрату та тирозину як стандартної амінокислоти. Центрифужну пробірку, що містить 1,0 мл казеїну (0,65% у 50 ммоль/л фосфатному буфері, рН 8) і 0,5 мл розведеного зразка кератинази інкубують при 45°C протягом 30 хв [77].

Приймаємо розведення кератинази в концентрації 0,5-1,0 мг/мл у стерильній воді [78].

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Фофанова С.С.			РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції кератинази	Літ.	Арк.
Перевір.		Стабніков В.П.					66
Реценз.							2
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Затверд.		Стабніков В.П.					

Для осадження нерозчинних білків реакцію зупиняють, додаючи 1 мл 20% (мас./об.) трихлороцтової кислоти і поміщають суміш на лід на 10 хв. Потім додають 0,2 мл реагенту Фоліна-Чокальтеу та 3 мл 0,4 моль/л карбонату натрію та перемішують. Пробірки інкубують в темряві при кімнатній температурі протягом 30 хв, а оптичну густину розчину вимірюють при 660 нм за допомогою мікропроцесорного двопроменевого спектрофотометра UV–Vis [79].

Одиницю (U) активності кератинази визначають як кількість ферменту, необхідного для вивільнення 1 мкмоль тирозину/мл/хв при 40 °C і рН 10,5 [79].

3) Вміст води (вологість)

Точну наважку субстанції кератинази 1,0 г поміщають у бюкс і зважують. Потім її сушать до постійної маси при температурі 100-110 °C. Термін "висушений до постійної маси" означає, що різниця між масами двох послідовних зважувань становить не більше 0,5 мг. Після висушування в сушильній шафі бюкс із зразком охолоджують до кімнатної температури в ексикаторі. Потім бюкс із випробовуваним зразком повторно зважують [80].

Вологість кератинази W, %, розраховують за формулою:

$$W = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m - m_2},$$

де m – маса бюкса з кератиназою до висушування, г; m₁ – маса бюкса з кератиназою після остаточного висушування, г; m₂ – маса пустого бюкса, г [80].

РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КОСМЕТИЧНОГО ЗАСОБУ ПРОТИ АКНЕ

8.1. Обґрунтування кінцевої форми, упаковки та вибору форми випуску

Фермент кератиназа (ЕС 3.4.99.11) є однією з груп серингідролаз, які руйнують дисульфідні водневі зв'язки в білках. Фермент також має здатність до зв'язування іонів металу з іонами кальцію. Це означає, що іони кальцію діють як кофактори для кератиназ; присутність іонів кальцію в середовищі може посилити їх активність. Структура кератинази робить її дуже ефективною у виконанні функції розкладання білків кератину. Органічні відходи містять велику кількість кератину, який залишається нерозкладеним через складність структури. Такі нерозчинні кератини можуть призвести до забруднення навколишнього середовища при відсутності пошуку способів їх утилізації [3].

При визначенні пріоритетів у сфері охорони здоров'я шкірні захворювання класифікуються як дрібні гравці у світовій лізі хвороб порівняно з хворобами, які спричиняють значну смертність, такими як ВІЛ/СНІД, пневмонія та туберкульоз. Однак проблеми зі шкірою, як правило, є одними з найпоширеніших захворювань, які спостерігаються в закладах первинної медичної допомоги в тропічних регіонах, а в деяких регіонах, де трансмісивні захворювання є ендемічними, вони стають домінуючими.

Хоча рівень смертності як правило нижчий, ніж при інших захворюваннях, потреби людей в ефективних засобах для лікування захворювань шкіри мають бути задоволені з ряду важливих причин [81].

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Технологічні особливості отримання косметичного засобу проти акне	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Фофанова Є.С.						
Перевір.		Стабніков В.П.					68	20
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

- По-перше, шкірні захворювання вкрай поширені, а кількість пацієнтів у закладах первинної медичної допомоги значна, тому ігнорувати їх не можна. Особливо часто страждають діти, що погіршує перебіг таких хвороб у такої вразливої групи.
- По-друге, захворюваність зумовлює зниження якості життя. Наприклад, захворюваність від вторинного целюліту при лімфатичному філяріатозі, що може призвести до прогресуючого збільшення кінцівок, є серйозною проблемою, а наступна нерухомість сприяє соціальній ізоляції.
- По-третє, відносні економічні витрати для сімей на лікування навіть незначних проблем зі шкірою обмежують застосування терапії. Як правило, люди змушені планувати свій бюджет таким чином, щоб покривати витрати на лікування, зменшуючи при цьому здатність купувати продукти першої необхідності.
- По-четверте, перевірка шкіри на ознаки захворювання є важливою стратегією у виявленні шкірних хвороб, однак базові знання простих особливостей захворювання, ознаки якого виникають на шкірі, часто відсутні на рівні первинної медичної допомоги.

Тому впровадження ефективних методів лікування шкірних хвороб призводить до значних переваг для громадського здоров'я. Заходи контролю є важливими для зменшення поширеності захворювань – так, було зроблено кілька систематичних спроб підтвердити програми боротьби з шкірними захворюваннями як заходи громадського здоров'я [81].

Статистичні дані Центру з контролю та профілактики захворювань показують, що приблизно 6 мільйонів людей у США щорічно отримують лікування від різних видів раку шкіри, при цьому щорічні витрати становлять майже 9 мільярдів доларів США. Безперечно, існує понад 2000 різних дерматологічних захворювань, які заслуговують на поглиблений огляд і дослідження [82].

Національний інститут артрити та захворювань опорно-рухового апарату та шкіри визначає 13 значних доброякісних захворювань шкіри. Незважаючи на

те, що за своєю суттю вони не є раковими, ці основні захворювання все ж негативно впливають на якість життя людей і можуть навіть перетворитися на небезпечні для життя стани у разі захворювання або ігнорування лікування.

Крім того, соціальна стигматизація щодо нерегулярних захворювань шкіри може викликати надмірний психологічний стрес у людини через ізоляцію та низьку самооцінку. Навіть у легких випадках уражена особа може бути примусово звільнена від повноцінної участі в очікуваних у суспільстві ролях через феномен захворювання. Варто також зазначити, що будь-яка демографічна група може захворіти на рак шкіри: вік, стать, раса та етнічна приналежність демонструють відмінності в тяжкості та захворюваності, але жодна група не може претендувати на імунітет. Враховуючи все, необхідно підкреслити важливість обізнаності та прогресу в дерматології, особливо враховуючи нових варіантів лікування шкірних захворювань, що підживлюється технологічним прогресом.

Акне – це стан, який виникає у разі блокування шкірних фолікулів з утворенням пробки з жиру, бактерій і мертвих клітин, які змішуються і набухають. Є багато факторів навколишнього середовища та поведінки, які сприяють розвитку акне, включаючи забруднення повітря, певні засоби догляду за шкірою, ліки, гормональні проблеми, харчування та стрес. Крім того, спостерігалось генетичне успадкування специфічних поліморфізмів, що робить фенотип акне більш помітним для певних етнічних груп.

Списки засобів лікування шкірних захворювань, у тому числі місцевих препаратів для шкіри, схвалених у США, можна знайти в Помаранчевій книзі Управління з контролю за продуктами й ліками (FDA) [82, 83].

Отже, запропоновано використання кератинази *Bacillus cereus* L10 у складі ензимного пілінгу для боротьби з постакне та акне у період ремісії.

Зважаючи на вищезазначене, пілінг буде використовуватись зовнішньо.

За глибиною проникнення в шкіру хімічні пілінги поділяють на поверхневі, середньої глибини та глибокі. Глибина проникнення визначається концентрацією, рН і типом використовуваного засобу для пілінгу [84].

Кератиназу *B. cereus* L10 запропоновано використовувати у малій концентрації 2%. Отже, припускаємо, що за такої концентрації пілінг буде належати до групи пілінгів поверхневої дії.

Поверхневий пілінг націлений на епідерміс і епідермально-дермальну межу, викликаючи частковий або повний некроз. Вони відлущують шкіру від рогового шару до папілярної дерми на глибині 60 мкм. Поверхневий хімічний пілінг спричиняє зниження адгезії корнеоцитів, епідермоліз і посилення відкладення колагену в шкірі. Це призводить до витончення рогового шару, збільшення товщини епідермісу та більш рівномірного розподілу меланіну. Поверхневі пілінги підходять для всіх фототипів шкіри за Фіцпатріком і можуть використовуватися на екстрафасціальних ділянках тіла (обличчя, верхні кінцівки, шия та груди) [85].

На ринку представлені різномантні продукти з ензимами для проведення пілінгу обличчя – розглянемо засобами у формах гелю, пасти та пудри.

Так, засіб SkinTra - Pink Pow(d)er являє собою багатофункціональну очищувально-ензимну пудру [86]. Слід відзначити, що така форма виробництва пілінгу для шкіри з акне буде недоцільною, оскільки форма пудри може травматично впливати на запальні елементи шкіри [87].

Інший засіб Elever Cosmetics – Panapi є ензимним пілінгом з екстрактом папаї та ананаса у формі пасти [88]. Така форма є менш травматичною, порівняно з порошковою, однак може виникнути потреба у більш ретельному нанесенні та змиванні, оскільки паста має досить високу щільність.

Розгладжуючий ензимний пілінг для обличчя Tofra - Dermo Face Enzyme з бромелаїном, папаїном та ферментом субтилізином представлений у формі гелю [89]. З точки зору споживчих характеристик, форма гелю є легкою у роботі з таким засобом, оскільки забезпечує легке нанесення й змивання, що не травмує шкіру, а забезпечує м'який догляд.

Отже, приймаємо форму випуску пілінгу проти акне у формі гелю.

Первинне та вторинне пакування косметичного продукту є важливою споживчою частиною продукту. Упаковка для косметичної продукції буває

різних типів, щоб відповідати різним форматам продукції, ціновому рівню та цільовим ринкам збуту. Правильний вибір упаковки сприятливо впливає на підвищення якості косметичної лінії, що одночасно захищає вміст пакування і обумовлює безпеку користувачів [90].

Для пакування косметичної продукції використовують пакувальні матеріали, кришки, дозатори та декоративні елементи. Скло, пластик та метал є поширеними матеріалами. Кришки, помпи, ковпачки, що закручуються, та інші типи закупорювальних засобів впливають на зручність використання. Хорошим рішенням є використання безповітряних помп, що допомагає запобігти забрудненню косметичних продуктів з сонцезахистом (SPF).

Унікальне тиснення, точкове УФ-покриття та інші вдосконалення упаковки відрізняють бренди класу «люкс» на конкурентному ринку. Вибраний тип упаковки справляє перше враження на клієнтів і передає якість, цінність та цільове використання продуктів. Розуміння цих форматів дозволяє виробникам інформувати свої цільові групи споживачів про властивості кожного продукту.

Існують різні форми упаковки косметичних засобів, кожна з яких має свої переваги та недоліки. Розглянемо деякі поширені приклади:

Банки

Баночки є одним з найпоширеніших видів косметичної упаковки. Вони добре підходять для густих кремів, масел для тіла та подібних продуктів. Скляні банки вважаються екологічно вигідними та естетично привабливими пакувальними засобами, оскільки можуть демонструвати барвисті продукти. Пластикові банки більш доступні і легкі. Кришки від банок можуть мати декоративне оздоблення.

Флакони

Флакони добре підходять для рідин і лосьйонів. Пластикові флакони легкі і доступні в багатьох формах - циліндрична, кругла, квадратна. Скляні флакони мають елегантний вигляд. Дозатори-насоси та ковпачки, що відкидаються, є популярними кришками для флаконів.

Туби

Туби ідеально підходять для кремів, гелів і мазей. Їхня гнучкість дозволяє легко дозувати продукт. Пластик і алюміній є поширеними матеріалами для туб. Туби характеризуються портативністю та гігієнічністю, забезпечують герметичність, а отже і уникнення контамінації продукту.

Флакони з крапельницями

Крапельниці забезпечують точне контрольоване дозування рідкого засобу, що включають ефірних масла, сироватки та тонери. Скляні крапельниці мають привабливий вигляд і підкреслюють рідкий вміст флакона. Крапельниці дозволяють регулювати дозування та запобігають забрудненню засобу. Вони також зручні у разі використання продукту в подорожах, оскільки зазвичай мають невелике дозування.

Відповідно до правил Європейського Союзу, пакування косметичного засобу має містити назву продукту, відповідальну особу, вміст, термін придатності тощо відповідно до Регламенту 1223/2009 [90].

Серед розглянутих видів упаковки зупинимо вибір на тубах. Таке первинне пакування пілінгу дозволить легко дозувати продукт, суттєво знизить ризик його контамінації, а також забезпечить належні умови зберігання продукту протягом усього терміну придатності.

Є три основні типи туб: алюмінієві (тобто металеві); полімерні; ламінатні, що виробляються з композитних матеріалів — поєднання пластику та алюмінію [91].

Алюмінієва туба не має зварних швів, а мембрана в її шийці є частиною самої туби. Завдяки багаторазовому згинанню «хвоста» туби продукт виходить практично герметично упакованим. Алюмінієві туби демонструють найвищі бар'єрні властивості у порівнянні з іншими видами упаковки. При деформації такі туби не повертаються у свій первісний стан, що запобігає потраплянню повітря всередину і, відповідно, окисленню продукту. Вони активно використовуються у фармацевтичній промисловості. Проте ці туби мають певні недоліки, зокрема, низьку стійкість до механічних впливів. При видавлюванні вмісту або випадковій деформації на поверхні можуть утворюватися вм'ятини,

що псує естетичний вигляд туби. У зоні таких вм'ятин може відбуватися руйнування декоративного покриття, що знижує привабливість готового виробу.

Полімерна туба являє собою безшовну, зручну, практичну, привабливу упаковку виготовлену з м'якого матеріалу - поліетилену. Туби з полімерного матеріалу можуть бути як прозорі, так і непрозорі, з лакованим глянцевою чи матовим покриттям в залежності від додавання спеціального пігменту до рецептури приготування матеріалу туби, а також від типу зовнішнього покриття.

Полімерні туби, завдяки еластичності матеріалу, не підлягають деформації під час використання. Після видавлювання вони всмоктують повітря і повертаються до свого первісного вигляду. Ця «гнучкість» досягається за рахунок відсутності залишкової деформації матеріалу, проте це не завжди є позитивним для вмісту. Оскільки разом з повітрям у тубу можуть потрапити бактерії. Серед недоліків таких туб варто відзначити низькі бар'єрні властивості, а також те, що пластик пропускає кисень і водяні пари. Тому полімерні туби не підходять для пакування продукції, для якої необхідні високі захисні характеристики упаковки.

Ламінатна туба — це ергономічна, зручна, універсальна та естетично приваблива упаковка. На ламінатних тубах обов'язково є шов, але сучасні технології дозволяють робити його надзвичайно акуратним і практично невидимим. Ламінатні туби зберігають свою форму під час транспортування та використання, що робить їх значно привабливішими за алюмінієві туби та більш ефективними за пластикові, з точки зору захисних характеристик. Це суттєва перевага у конкуренції за увагу споживачів. Ламінатні туби об'єднують всі переваги алюмінієвих варіантів, водночас пропонуючи широкі можливості для творчого оформлення та зручності в використанні [91, 92].

Таким чином, зупинимось на використанні ламінатних туб для пілінгу з кератиназою.

Кожна туба з пілінгом буде поміщена у картонну коробку, що міститиме інформацію про назву, склад пілінгу, основну дію, показання, дату виготовлення, термін придатності та виробника продукту.

8.2. Технологія виробництва пілінгу з кератиназою

Перш за все, потрібно визначитись зі складом пілінгу.

На ринку України представлений ензимний гель-пілінг для обличчя виробництва YUKA Nature Cosmetics [93]. В складі пілінгу присутній компонент Keratoline® - це фермент протеаза, отриманий культивуванням *Bacillus subtilis*. Ферментуюча дія такого компоненту сприяє розгладженню шкіри і м'яко стимулює процес клітинного оновлення, усуває мертві ороговілі клітини шкіри. Склад засобу:

- Активні речовини: альгінат натрію, гідролат лимону, *Bacillus* ензими, пантенол, рослинний гліцерин;
- Допоміжні речовини: каприловий / каприновий тригліцерид, бетаїн, акрилоїлдиметилтаурат амонію (VP сополімер), бензиловий спирт, дегідрооцтова кислота.

Візьмемо склад даного пілінгу за основу для розробки пілінгу з кератиназою *B. cereus* L10. Тоді склад пілінгу власого виробництва буде наступний:

- Активні речовини: кератиназа *Bacillus cereus* L10;
- Допоміжні речовини: альгінат натрію, пантенол, гліцерин, акрилоїлдиметилтаурат амонію (VP сополімер), бензиловий спирт, дегідрооцтова кислота, вода очищена.

Далі розглянемо функції і відсоток введення кожного компоненту пілінгу.

Кератиназа *Bacillus cereus* L10 – активний компонент, відсоток введення 2% до рецептури.

Альгінат натрію використовується як допоміжна речовина, а саме загусник, гелеутворювач і стабілізатор. Стаття [94] засвідчує, що альгінат натрію вводять до складу косметичних засобів у кількості 1-3%. Приймемо, що будемо вводити цей компонент у склад пілінгу в кількості 3%.

Пантенол – це речовина, що забезпечує відновлення та зволоження шкіри, що особливо важливо у разі лікування шкіри такими активними компонентами як ферменти. Досліджено концентрації 0,5%, 1% та 5% пантенолу у складі засобів для шкіри [95]. Приймаємо відсоток введення пантенолу 3%.

До рецептури пілінгу можна ввести додаткові компоненти для живлення й зволоження шкіри. Стаття [96] засвідчує, що гліцерин у складі пілінгу є зволожувачем, що чинить сприятливий ефект на стан шкіри за дії таких активних речовин як ензими.

Гліцерин можна знайти у продуктах, розроблених для немовлят, літньої, сухої, жирної та чутливої шкіри. Крім потужних зволожуючих властивостей, гліцерин також не містить жирів і не є комедогенним. Ось чому він є чудовим зволожувачем для жирної та схильної до акне шкіри. Це допомагає запобігти закупоренню пор, а також заспокоює наявні висипання, щоб запобігти їх подальшому поширенню [97].

Гліцерин використовується в косметичних композиціях у концентрації 1-5% як зволожувач та кондиціонуючий агент [98]. Отже, будемо додавати гліцерин до рецептури пілінгу в концентрації 5% для посилення відновлення стану шкіри.

Акрилоїлдиметилтаурат амонію (VP сополімер) використовується як гелеутворювач для водних систем і текстуратор, загущувач для емульсій масло-у-воді. Використовується для створення емульсій, які добре розтікаються і швидко вбираються. Стабілізує нерозчинні у воді жиророзчинні компоненти, без використання додаткових емульгаторів. Забезпечує відчуття свіжості та легкості шкіри без відчуття липкості на шкірі, тому використовується у складі косметичних гелів [99].

Використовується у складі косметичних засобів в діапазоні від 0,5 до 1,2% [100].

Прийmemo, що будемо додавати 1% даної речовини до складу пілінгу для стабілізації текстури гелю.

Бензиловий спирт зазвичай використовують як консервант у косметичі та засобах особистої гігієни. Бензиловий спирт має антимікробні властивості, які роблять його ефективним у запобіганні росту мікроорганізмів у косметичних засобах. Його часто використовують у концентраціях від 0,5% до 2% як консервант у різноманітних продуктах, включаючи шампуні, лосьйони, креми, гелі тощо [101].

Таким чином, з метою запобігання контамінації пілінгу з кератиназою бензиловий спирт будемо вводити до складу пілінгу у концентрації 1,5%.

Дегідрооцтова кислота також широко використовується в косметичній промисловості як ефективний консервант. Ця сполука зазвичай міститься в лосьйонах, кремах, шампунях, кондиціонерах та інших композиціях на водній основі. Дегідрооцтова кислота служить антимікробним агентом, забезпечуючи безпеку та цілісність продукту, характеризується стабільністю у різних рецептурах і сумісністю з іншими консервантами. Дегідрооцтова кислота є безпечним інгредієнтом при використанні в межах рекомендованих рівнів – не більше 0,6% [102]. Тому цей консервант вводимо до рецептури у концентрації 0,5%.

Вода очищена виступає розчинником компонентів рецептури.

При розрахунку техніко-економічного обґрунтування було прийнято, що на одне застосування витрачається 5 г пілінгу. Прийнято забезпечення пілінгом жінок упродовж 56 днів на рік. Тоді $5 \times 56 = 280$ г пілінгу. Округлимо отримане значення до **300** г. Отже, приймаємо, що в 1 тубі буде міститись 300 г пілінгу.

Розрахунок компонентів на серію 500 л пілінгу подано у таблиці 8.1.

Таблиця 8.1

Розрахунок складових компонентів пілінгу з кератиназою

Компонент	Частка, %	Кількість на серію 500 л, кг
Кератиназа	2	10
Альгінат натрію	3	15
Пантенол	3	15

Гліцерин	5	25
Акрилоїлдиметилтаурат амонію	1	5
Бензиловий спирт	1,5	7,5
Дегідрооцтова кислота	0,5	2,5
Вода очищена	84	420

Далі слід визначити порядок розчинення компонентів для приготування гелю-пілінгу.

Перш за все, отримують зі складу та відважують сировину. Сировина проходить вхідний контроль, після чого може бути використана для виробництва. На вагах відважують компоненти гелю, потім мірником відмірюють необхідну кількість води.

Зважений альгінат натрію та акрилоїлдиметилтаурат амонію додають до реактора з водою, нагрітою до 50-55°C. Перемішують за допомогою перемішуючого пристрою протягом 30 хв при 200-250 об/хв. Протягом доби гелеву основу залишають для набухання.

Окремо змішують пантенол та гліцерин за температури 30-35 °C, підтримуючи температуру в реакторі шляхом подачі пари до сорочки апарату. Перемішують протягом 20 хв при 100 об/хв. Отриманий розчин пропускають через фільтр у реактор та подають до етапу змішування з гідрофільною фазою.

У окремий реактор з водою додають кератиназу, бензиловий спирт та дегідрооцтову кислоту. Перемішують за кімнатної температури при 50-100 об/хв до повного розчинення. Всі компоненти на даному етапі легко розчиняються у воді.

В реактор з мішалкою, що містить приготовану гелеву основу, поступово при перемішуванні 50-100 об/хв за температури 40-50 °C подають суміш пантенолу та гліцерину. Здійснюють гомогенізацію протягом 30-40 хв під вакуумом, щоб уникнути аерації гелю. Далі додають водний розчин кератинази

з консервантами. Перемішують при 200-300 об/хв за температури 40-50 °С протягом 20-30 хв.

Далі гелеву масу гомогенізують протягом 30 хв при вакуумі 0,05-0,05 МПа, щоб уникнути аерації гелю. Після цього відбирають проби для контролю якості нерозфасованої продукції та направляють на фасування й пакування у первинну та вторинну упаковку відповідно [103].

8.3. Специфікація обладнання для отримання гелю пілінгу

Таблиця 8.2

Специфікація обладнання для виробництва пілінгу з кератиною у формі гелю

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Д-1	Ваговий дозатор	1	Ваги бункерні «Норма-ТН». Продуктивність до 70 м³/год. Похибка зважування - не більше 0,1%. Вага однієї порції – до 80 кг. Робочий об'єм вагового бункера – 80 л. Компанія: «АГРО-СІМО-МАШБУД» (Україна) [104]
Р-2	Реактор 1000 л	1	Реактор РС-1000 об'ємом 1000 л. Обладнаний сорочкою, тиск у сорочці до 3 бар, температура в сорочці до 115 °С. Матеріали – сталь AISI 316 L (03X17H9M2) та сталь AISI 304 (07X17H9). Габаритні розміри: довжина 1750 мм, ширина 1600 мм, висота 2300 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [105]
Н-3 Н-10	Насос	2	Кулачковий насос серії DW. Продуктивність: до 1 016 л/за 100 об/хв. Температура: до +210°С. Матеріали: нержавіюча сталь AISI 316L. Компанія: «АСКО ПАМПС» (Україна) [106]
Р-4 Р-7	Реактор 70 л	2	Реактор РГС 50 л GMP. Робочий об'єм реактора 50 л. Номінальний об'єм реактора 70 л. Встановлена мішалка. Матеріали виготовлення – сталь AISI 316 L та сталь AISI 304. Габаритні розміри: довжина 900 мм, ширина 1156 мм, висота 1510 ±20 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [107]

Продовження таблиці 8.2

Н-5 Н-8	Насос	2	Насос для в'язких речовин (гліцерину). Придатний для в'язких середовищ до 50000 сРс. Продуктивність 3 м³/год. Тиск на виході 4 бар. Компанія: «DEBEM» (Італія) [108]
Ф-6	Фільтр для суміші пантенолу та гліцерину	1	Гідрофобний картриджний фільтр Dugarore з розміром пор 0,22 мкм. Зона фільтрації 0,69 м². Матеріал полівініліденфторид (PVDF). Витримує стерилізацію SIP протягом 30 циклів по 30 хв при 126 °С. Компанія: «Merck» (Німеччина) [109]
Р-9	Реактор 500 л	2	Реактор РСДП-500 ВК для м'яких лікарських форм із диспергатором робочим об'ємом 500 л. Призначення даного реактора: приготування мазей, гелів, емульсій та суспензій. Встановлена якірна мішалка. Габаритні розміри: довжина – 1800 мм, ширина – 1600 мм, висота з опущеною кришкою – 2400 мм, висота з піднятою кришкою – 3100 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [110]
Ф-11	Фільтр для розчину АФІ	1	Гідрофільний багатошаровий фільтр Dugarore з розміром пор 0,22 мкм. Зона фільтрації 0,55 м². Матеріал поліпропілен. Можна автоклаувати протягом 30 циклів по 60 хвилин при 126°С або стерилізувати парою до 30 разів по 30 хвилин при 135 °С. Компанія: «Merck» (Німеччина) [111]
Г-12	Гомогенізатор	1	Гомогенізатор роторний ГРП-120 пересувний. Гомогенізатор призначений для приготування високодисперсних, гомогенізованих емульсій і суспензій, багатокомпонентних складів із складних і нерозчинних речовин. Продуктивність (по воді) - 1,0÷2,5 м³/годину, плавно регульована. Швидкість обертання ротора - 1500÷3000 об/хв, плавно регульована. Матеріали виготовлення частин: сталь AISI 316 L та AISI 304. Компанія: «Промвіт» (Україна) [112]
ТМ-13	Тубонаповнювальна машина	1	Автомат АТЛ для фасування в ламінатні туби. Продуктивність 20 уп/хв. Витрата стисненого повітря 40 л/хв (при 0,6 МПа). Компанія: «НВП ІНТА» (Україна) [113]

ПМ-14	Пакувальна машина	1	Горизонтальна картонажна машина крокового типу Vox 60H Nomatech. Упаковка: картонна тара. Продукт вкладається в картонну упаковку, після чого упаковка заклеюється і закривається. Вихідний конвеєр машини може бути додатково оснащений пристроєм для надрукування та нанесення етикеток. Електричний захист машини – IP 54. Продуктивність машини: до 60 упаковок/хв. Компанія: «GVP Equipment Solutions» (Україна) [114]
-------	-------------------	---	---

8.4. Опис технологічного процесу виробництва пілінгу з кератиназою

ДР 1. Підготовка виробництва

ДР 1.1. Отримання сировини зі складу

Після успішного проходження вхідного контролю зі складу отримують: кератиназу, альгінат натрію, пантенол, гліцерин, акрилоїлдиметилтаурат амонію, бензиловий спирт, дегідрооцтову кислоту. З сектору підготовки води отримують воду очищену. Отримані компоненти передають на відважування.

ДР 1.2. Відважування сировини

За допомогою вагового дозатора Д-1 відважують наважки: 10 кг кератинази, 15 кг альгілату натрію, 15 кг пантенолу, 25 кг гліцерину, 5 кг акрилоїлдиметилтаурату амонію, 7,5 кг бензинового спирту, 2,5 кг дегідрооцтової кислоти.

Відважену сировину направляють до ТП 2.1, ТП 2.2, ТП 2.3.

ТП 2. Технологічні стадії розчинення компонентів гелю

ТП 2.1. Приготування гелевої основи

До реактора Р-2 об'ємом 1000 л за допомогою мірника через трубопровід подають 200 л води очищеної. Подають пару до сорочки реактора до досягнення температури води 50-55°C. Додають відважений альгінат натрію від ДР 1.2, перемішують за допомогою перемішуючого пристрою протягом 15 хв при 200-250 об/хв. Далі додають зважені 5 кг акрилоїлдиметилтаурату амонію

від ДР 1.2, продовжують перемішування протягом 15 хв при 200-250 об/хв. Протягом доби гелеву основу залишають для набухання.

Готова гелева основа надходить на змішування до ТП 3.1.

ТП 2.2. Приготування суміші пантенолу та гліцерину

До реактора Р-4 номінальним об'ємом 70 л подають 15 кг пантенолу та 25 кг гліцерину від ДР 1.2.

Змішують пантенол та гліцерин за температури 30-35 °С, підтримуючи температуру в реакторі шляхом подачі пари до сорочки апарату. Перемішують протягом 20 хв при 100 об/хв. Отриманий розчин насосом Н-5 подають з реактора та пропускають через фільтр Ф-6 у реактор Р-7 та насосом Н-8 подають до етапу змішування з гідрофільною фазою до ТП 3.1.

ТП 2.3. Приготування розчину АФІ з консервантами

У окремий реактор Р-9 об'ємом 500 л за допомогою мірника через трубопровід подають 200 л води очищеної. При перемішуванні 50-100 об/хв за кімнатної температури подають відважені 10 кг кератинази, 7,5 кг бензилового спирту та 2,5 кг дегідрооцтової кислоти від ДР 1.2. Перемішують до повного розчинення.

Насосом Н-10 готовий розчин передають до фільтру Ф-11, після чого профільтрований розчин АФІ передають до ТП 3.1.

ТП 3. Приготування гелю

ТП 3.1. Змішування компонентів гелю

У реактор Р-2 з попередньо приготованою гелевою основою (від ТП 2.1) поступово при перемішуванні 50-100 об/хв за температури 40-50 °С подають суміш пантенолу та гліцерину від ТП 2.2. Здійснюють гомогенізацію протягом 30-40 хв під вакуумом, щоб уникнути аерації гелю. Далі додають водний розчин кератинази з консервантами від ТП 2.3. Перемішують при 200-300 об/хв. Додають 20 л води та продовжують перемішування в режимі 200-300 об/хв за температури 40-50 °С протягом 20-30 хв. Насосом Н-3 гелеву масу передають на гомогенізацію.

ТП 3.2. Гомогенізація гелю

Гелеву масу гомогенізують в гомогенізаторі Г-12 протягом 30 хв при вакуумі 0,05 МПа, щоб уникнути аерації гелю. Після цього відбирають проби для контролю якості нерозфасованої продукції та направляють на фасування до ТП 4.1.

ТП. 4. Фасування

ТП 4.1. Наповнення туб гелем

Зі складу отримують туби та ковпачки. До тубонаповнювальної машини ТМ-13 подають гомогенізований гель від ТП 3.2. Здійснюють наповнення туб по 300 г гелю в ламінатні туби. Продуктивність 20 туб/хв.

Здійснюють контроль точності дозування, продуктивності тубонаповнювальної машини та коректність нанесення маркування на туби.

ПМВ 5. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 5.1. Пакування туб

Туби від ТП 4.1 в автоматичному режимі подають до пакувальної машини ПМ-14. Туби з інструкцією до застосування пакують в картонні пачки.

ПМВ 5.2. Відвантаження

На пакувальному столі вручну пакують пачки з тубами в групові картонні коробки. Відвантажують коробки на склад.

8.5. Методи контролю. Технічні умови на гель пілінг з кератиназою

Таблиця 8.3

Показники якості гелю пілінгу з кератиназою

Найменування показника	Норма
Зовнішній вигляд	Однорідна гелеподібна маса
Колір	Молочний
Запах	Нейтральний
Масова частка води і летких речовин, %	84
Водневий показник рН	5,5-7,0
Колоїдна стабільність	Стабільний

Термостабільність	Стабільний
Пакування	Ламінатна туба, поміщена у картонну коробку
Маркування	Назва продукту, склад, маса нетто. Інструкція по застосуванню. Дата виготовлення і термін придатності. Інформація про виробника та країну виробництва. Попередження про можливі алергічні реакції.
Термін придатності	24 місяці з дати виготовлення при правильному зберіганні (від 5°C до 25°C, захищати від прямих сонячних променів).

Методи контролю

Зовнішній вигляд

Визначають візуально на предметному склі або білому папері. Пілінг являє собою однорідну гелеподібну масу.

Колір

Визначають візуально. Має бути молочним.

Запах

Визначають органолептично, має бути нейтральним.

Масова частка води і летких речовин

Для проведення визначення річковий пісок промивають дистильованою водою та заливають розчином соляної кислоти на 24 години. Потім пісок промивають дистильованою водою до нейтральної реакції по метиленовому жовтогарячому та висушують на повітрі. Висушений пісок просіюють та прокалюють в муфельній печі при температурі 500°C протягом 5 годин. У склянку зважують 10–12 г підготовленого піску та скляну паличку. Склянку висушують в сушильній шафі при температурі 103°C до тих пір, поки

розходження між двома послідовними зважуваннями не буде перевищувати 0,002 г.

У склянку зі скляною паличкою та піском зважують 2,0 г крему. Склянку поміщують в сушильну шафу та висушують при температурі 103°C протягом 3 годин. Після висушування склянку охолоджують, витримують в ексикаторі протягом 30 хвилин та зважують. Висушування (30 хвилин) повторюють до тих пір, поки розходження між двома послідовними зважуваннями не буде перевищувати 0,002 г.

Масову частку води та летких речовин розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100$$

Масову частку сухої речовини розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100$$

де m_1 — маса склянки з піском і скляною паличкою, г;

m_2 — маса склянки з піском, скляною паличкою і продуктом до висушування, г;

m_3 — маса склянки з піском, скляною паличкою і продуктом після висушування, г.

Водневий показник рН

Вимірювання проводять в водній витяжці: 10,0 г продукту переносять в термостійку склянку, додають 90 мл дистильованої води та нагрівають при постійному перемішуванні до температури 80°C до повного розшарування емульсії. Охолоджують до 20°C, відокремлюють водний шар та визначають в ньому рН. Визначення рН проводять потенціометрично за допомогою скляного електроду [115].

Колоїдна стабільність

Метод заснований на розшаруванні емульсії на жирову і водну фазу при центрифугуванні. Дві пробірки заповнюють на 2/3 об'єму кремом та зважують. Різниця маси пробірок з емульсією не повинна перевищувати 0,2 г. Пробірки

поміщують на водяну баню та витримують 20 хвилин при температурі 42–450С (для густих емульсій) та при температурі 22–250С для рідких емульсій. Пробірки виймають, протирають їх з зовнішнього боку та встановлюють в центрифугу. Центрифугування проводять протягом 5 хвилин при частоті обертання 100 с⁻¹. Пробірки виймають та визначають стабільність емульсії.

Якщо тільки в одній пробірці спостерігається розшарування, випробування повторюють з новими порціями крему. Якщо не спостерігається чіткого розшарування емульсії, вміст пробірки виливають на лист білого паперу та відмічають наявність або відсутність розшарування емульсії. Емульсію вважають стабільною, якщо після центрифугування в пробірках спостерігають виділення не більше краплі водної фази або шару масляної фази не більше 0,5 см.

Термостабільність

Три пробірки діаметром 14 мм висотою 120 (100) мм наповнюють на 2/3 об'єму кремом, спостерігаючи за тим, щоб в емульсії не залишалось бульбашок повітря, закорковують та поміщують в термостат з температурою 40–42°С, при визначення термостабільності емульсії вода/масло вміст пробірок після 1 години термостатування обережно перемішують скляною паличкою для видалення повітря. Емульсії витримують в термостаті протягом 24 годин і потім визначають стабільність. Емульсію вважають стабільною, якщо після термостатування в пробірках не спостерігають виділення водної фази. Допускається виділення шару масляної фази не більше 0,5 см [115].

Пакування

Ламінатна туба, поміщена у картонну коробку. Первинна упаковка повинна бути герметичною, запобігаючи проникненню повітря і вологи. Картонна пачка має бути цілісною та містити відповідне маркування.

Маркування

Визначають візуально. Має містити таку інформацію:

- Назва продукту, склад, маса нетто.
- Інструкція по застосуванню.

- Дата виготовлення і термін придатності.
- Інформація про виробника та країну виробництва.
- Попередження про можливі алергічні реакції.

Термін придатності

24 місяці з дати виготовлення при правильному зберіганні (від 5°C до 25°C, захищати від прямих сонячних променів).

РОЗДІЛ 9. СКЛАДАННЯ ПАТЕНТНОЇ ЗАЯВКИ. СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТУ ТРИПСИН-ПОДІБНИХ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ДЛЯ ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО ВВЕДЕННЯ

Сфера до якої відноситься корисна модель

Препарати трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення використовуються в різних сферах медицини. Наприклад, препарати трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення використовуються для лікування різних захворювань, пов'язаних з порушенням фібринолізу. Фібринолізис - це процес розчинення фібрину, який є основним компонентом згустків крові. Такі ферменти, як урокиназа, активін-VIIa та плазмін, діють шляхом активації плазміногену, який є попередником плазміну. Плазмін потім розщеплює фібрин, що призводить до розчинення згустків крові [116, 117].

Спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення

Винахід належить до біотехнології та медицини і являє собою спосіб одержання препарату протеолітичних ферментів трипсинового ряду для внутрішньосудинного введення як засіб контролю тканинного протеолізу під час лікування та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом протеолітичних та активаційних процесів, як то - набряк, запалення, порушення імунної та гемостатичної систем, онкозахворювання, тощо[патент на винахід №38270].

					НУХТ БТЕК 02.01.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Фофанова Є.С.			РОЗДІЛ 9. складання патентної заявки. спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					88	5
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Винахід належить до біотехнології та медицини і являє собою спосіб одержання препарату протеолітичних ферментів трипсинового ряду для внутрішньосудинного введення як засіб контролю тканинного протеолізу під час лікування та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом протеолітичних та активаційних процесів, як то - набряк, запалення, порушення імунної та гемостатичної систем, онкозахворювання, тощо.

Відомо, що для терапії та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом протеолітичних та активаційних процесів, обмежено застосовується локальне внутрішньом'язове введення протеолітичних ферментів трипсинового ряду [116, 117]. Натомість, внутрішньосудинне введення трипсинподібних ферментів вкрай обмежене через ряд побічних ефектів, спричинених здатністю введених ферментів як безпосередньо, так і опосередковано у комплексі з α_2 - макроглобуліном викликати надмірну та фізіологічне не виправдану активацію проферментів та профакторів крові.

До аналогів даного винаходу належить спосіб отримання групи препаратів системної ензимотерапії, призначених для перорального введення капсульованих комбінацій ферментних препаратів тваринного та рослинного походження з резорбцією частини ферментів у кровообіг після розчинення капсульних оболонок у нижній ділянці тонкої кишки. Недоліки способу-аналогу полягають у малій резорбції ферментів у кровообіг, що спричинює до необхідності введення великих кількостей ферментів, обумовлює можливість побічних процесів та веде до зростання вартості курсу лікування.

Як прототип обрано спосіб одержання призначеного для внутрішньосудинного введення препарату кристалічного β -трипсину за методом Нортропа-Кунітца. Спосіб-прототип полягає в екстракції гомогенату підшлункової залози великої рогатої худоби та свиней, фракційному висолюванні білкового розчину сульфатом амонію, екстракції проферменту - трипсиногену - 0,25 н розчином сірчананої кислоти, висолюванні екстракту сульфатом амонію, кристалізації трипсиногену та подальшої його активації в активний фермент β -трипсин.

Недоліки способу-прототипу полягають у здатності отриманого препарату за умов внутрішньосудинного введення викликати негативну реакцію організму через надмірну та фізіологічно невиправдану гідролітичну та активаційну дію, що практично виключає внутрішньосудинне введення отриманого у спосіб-прототип ферментного препарату.

Задача винаходу полягає в розробці способу отримання придатного до внутрішньосудинного введення препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів, позбавленого зазначених недоліків отриманого у спосіб-прототип препарату.

Поставлена задача досягнута завдяки введенню додаткової технологічної процедури - взаємної обмеженої протеолітичної деградації серинових та тіолових протеїназ з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн.

На відміну від способу-прототипу, що полягає в отриманні та внутрішньосудинному введенні недеградованого трипсину (так званої β -форми), головною діючою складовою частиною отриманого у запропонований спосіб препарату є протеолітично деградовані форми трипсину, утворювані за рахунок попередньої часткової протеолітичної деградації. Отримуваний у запропонований спосіб препарат за умов внутрішньосудинного введення не виявляє помітної імунної реакції та надмірної активації білків крові, чим усуваються побічні негативні ефекти та зумовлюється можливість застосування препарату як внутрішньосудинного лікарського засобу. Мала імуногенність отриманого у запропонований спосіб препарату дозволяє проводити їх клінічне застосування в широкому діапазоні умов щодо концентрацій, доз, часу введення, тощо. В порівнянні зі способом-аналогом запропонований підхід дозволяє досягти необхідного терапевтичного ефекту, завдяки значно меншим кількостям ферментного препарату, чим запобігаються можливі побічні ефекти та істотно зменшується вартість лікарського курсу.

Тим самим розроблено спосіб одержання придатного до внутрішньосудинного введення малоімуногенного, малотоксичного та

недорогого препарату протеолітичних ферментів трипсинового ряду, що може бути використаний для підвищення ефективності терапії обумовлених дисбалансом тканинного та судинного протеолізу патологічних процесів[патент на винахід №38270].

Спосіб одержання препарату та дослідження його дії визначається відповідно до наведених прикладів.

Приклад 1. Одержання частково деградованої форми трипсину. Одержання полягає в попередній інкубації розчину серинових та тіолових протеолітичних ферментів з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн за рН $6,7 \pm 2,3$ при 37°C протягом 30-180 хвилин з подальшою ліофільною сушкою отриманого препарату. Отриманий препарат являє собою білий аморфний порошок, придатний до тривалого зберігання за температури $0-5^{\circ}\text{C}$ протягом шести місяців[патент на винахід №38270].

Наведені результати свідчать про малу токсичність отриманого у запропонований спосіб препарату та його придатність до внутрішньосудинного введення. Одержаний у запропонований спосіб препарат має низьку імуногенність, що дозволяє досягти пролонгованої дії препарату, дає змогу обмежити кількість введень та зумовлює збереження ефективності дії препарату протягом всього курсу[патент на винахід №38270].

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення, що включає послідовну екстракцію з біологічної сировини та фракційне осадження проферменту - трипсиногену, його активацію, ліофільну сушку, укупорку і стерилізацію, розчинення в фізіологічному розчині та внутрішньосудинне введення, відмінний тим, що ферментативну складову частину препарату піддають попередній взаємній обмеженій протеолітичній деградації ферментами з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн за рН $6,7 \pm 2,3$ при $20-37^{\circ}\text{C}$ протягом 30-180 хвилин [патент на винахід №38270].

РЕФЕРАТ

Запропонований винахід дає змогу одержати ефективний терапевтичний засіб для лікування та профілактика захворювань, пов'язаних з дисбалансом в регуляції активності протеолітичних ферментів. Запропонований спосіб дає змогу різко знизити імуногенність та токсичність кінцевого препарату. Заявлено спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення, що включає послідовну екстракцію з біологічної сировини та фракційне осадження проферменту - трипсиногену, його активацію, ліофільну сушку, укупорку і стерилізацію, розчинення у фізіологічному розчині та внутрішньосудинне введення, відмінний тим, що ферментативну складову частину препарату піддають попередній взаємній обмеженій протеолітичній деградації ферментами з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн за рН $6,7 \pm 2,3$ при $20-37^{\circ}\text{C}$ протягом 30-180 хвилин [патент на винахід №38270] [118].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4), 923–942.
2. Chandan, C, Harshitha, Arun Pardhe, Gowthamarajan, K, Sushma, B V, Phani, Kumar G, Jeyaprakash, M R (2022). Systematic approach & Application in relevance to Economic & Therapeutic actions of Proteolytic Enzyme: A Review. *Journal of Positive School Psychology*, 6(6), 10476–10486.
3. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
4. Ioannou E, Labrou NE. (2022). Development of Enzyme-Based Cosmeceuticals: Studies on the Proteolytic Activity of *Arthrospira platensis* and Its Efficient Incorporation in a Hydrogel Formulation. *Cosmetics*, 9(5), 106. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9050106>.
5. Javee, Anand & Sathuvan, Malairaj & Subramani, Nagaraj. (2022). Biosynthesis, protease optimization and purification of alkaline serine from *Shewanella* algae and its potential application as silver recovery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 25. 100595. 10.1016/j.scp.2021.100595.
6. Nnolim, N. E., Udenigwe, C. C., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2020). Microbial Keratinase: Next Generation Green Catalyst and Prospective Applications. *Frontiers in microbiology*, 11, 580164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580164>.
7. Sypka, M., Jodłowska, I., & Białkowska, A. M. (2021). Keratinases as Versatile Enzymatic Tools for Sustainable Development. *Biomolecules*, 11(12), 1900. <https://doi.org/10.3390/biom11121900>.
8. Jana, Arijit & Halder, Suman & Dasgupta, Diptarka & Hazra, Saugata & Mondal, Prasenjit & Bhaskar, Thallada & Ghosh, Debashish. (2020). Keratinase Biosynthesis from Waste Poultry Feathers for Proteinaceous Stain Removal. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 8. 17651-17663. 10.1021/acssuschemeng.0c04378.

9. Sharma, I., Gupta, P., & Kango, N. (2023). Synthesis and characterization of keratinase laden green synthesized silver nanoparticles for valorization of feather keratin. *Scientific reports*, 13(1), 11608. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38721-6>.
10. Hassan, M. A., Taha, T. H., Hamad, G. M., Hashem, M., Alamri, S., & Mostafa, Y. S. (2020). Biochemical characterisation and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorisation of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex. *International journal of biological macromolecules*, 153, 561–572. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.032>.
11. Zhang, R. X., Wu, Z. W., Cui, H. Y., Chai, Y. N., Hua, C. W., Wang, P., Li, L., & Yang, T. Y. (2022). Production of surfactant-stable keratinase from *Bacillus cereus* YQ15 and its application as detergent additive. *BMC biotechnology*, 22(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00757-3>.
12. Derhab, Neama & Mabrouk, Mona & El-Metwally, Mohammad & Mohammed, Youssef. (2023). Thermostable keratinase from *Bacillus cereus* L10: optimization and some potential biotechnological applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 1-17. [10.1007/s13399-023-04887-2](https://doi.org/10.1007/s13399-023-04887-2).
13. Kokwe, L., Nnolim, N.E., Ezeogu, L.I., Sithole, B.B., & Nwodo, U.U. (2023). Thermoactive metallo-keratinase from *Bacillus* sp. NFH5: Characterization, structural elucidation, and potential application as detergent additive. *Heliyon*, 9.
14. Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Zraï Jaouadi, N., Joseph, M., Hacene, H., Ollivier, B., Fardeau, M. L., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2016). Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *International journal of biological macromolecules*, 86, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.074>.
15. Matkawala, F., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2021). Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World journal of microbiology & biotechnology*, 37(4), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03036-z>.

16. Jagadeesan, Y., Meenakshisundaram, S., Saravanan, V., & Balaiah, A. (2020). Sustainable production, biochemical and molecular characterization of thermo-and-solvent stable alkaline serine keratinase from novel *Bacillus pumilus* AR57 for promising poultry solid waste management. *International journal of biological macromolecules*, 163, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.219>.
17. Ouelhadj, A., Bouacem, K., Asmani, K. L., Allala, F., Mechri, S., Yahiaoui, M., & Jaouadi, B. (2020). Identification and homology modeling of a new biotechnologically compatible serine alkaline protease from moderately halotolerant *Gracilibacillus boracitolerans* strain LO15. *International journal of biological macromolecules*, 161, 1456–1469. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.266>.
18. Barman, N. C., Zohora, F. T., Das, K. C., Mowla, M. G., Banu, N. A., Salimullah, M., & Hashem, A. (2017). Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. *AMB Express*, 7(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0462-6>.
19. Dedavid e Silva, Lucas Andre & Macedo, Alexandre & Termignoni, Carlos. (2014). Production of keratinase by *Bacillus subtilis* S14. *Annals of Microbiology*. 64. 1725-1733. 10.1007/s13213-014-0816-0.
20. Akhter, M., Wal Marzan, L., Akter, Y., & Shimizu, K. (2020). Microbial Bioremediation of Feather Waste for Keratinase Production: An Outstanding Solution for Leather Dehairing in Tanneries. *Microbiology insights*, 13, 1178636120913280. <https://doi.org/10.1177/1178636120913280>.
21. Al-Bedak OAM, Moharram AM, Hussein NA, Taha DM. (2022). Microbial bioremediation of feather wastes and eco-friendly production of keratinase and collagenase enzymes by *Didymella keratinophila*, the first-recorded fungus from Assiut, Egypt. *Research Square*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-1645003/v1.
22. Renitta, Emilin & Samrot, Antony. (2020). Optimization of Keratinase Production Using *Pseudomonas aeruginosa* SU-1 Having Feather as Substrate. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 10. 6540 - 6549. 10.33263/BRIAC105.65406549.

23. Gafar, Aa'ishah & Bin Khayat, Mohd Ezuan & Ahmad, Siti Aqlima & Yasid, Nur & Shukor, Yunus. (2020). Response Surface Methodology for the Optimization of Keratinase Production in Culture Medium Containing Feathers by *Bacillus* sp. UPM-AAG1. *Catalysts*. 10. 848. 10.3390/catal10080848.
24. Rahimnahal, S., Meimandipour, A., Fayazi, J., Asghar Karkhane, A., Shamsara, M., Beigi Nassiri, M., Mirzaei, H., Hamblin, M. R., Tarrahimofrad, H., Bakherad, H., Zamani, J., & Mohammadi, Y. (2023). Biochemical and molecular characterization of novel keratinolytic protease from *Bacillus licheniformis* (KRLr1). *Frontiers in microbiology*, 14, 1132760. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132760>.
25. Wu, Sijin & Zhou, Xuwei & Jin, Zhicheng & Cheng, Haiming. (2023). Collagenases and their inhibitors: a review. *Collagen and Leather*. 5. 10.1186/s42825-023-00126-6.
26. Tohar, R., Ansbacher, T., Sher, I., Afriat-Jurnou, L., Weinberg, E., & Gal, M. (2021). Screening Collagenase Activity in Bacterial Lysate for Directed Enzyme Applications. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8552. <https://doi.org/10.3390/ijms22168552>.
27. Van Wart, H. E. (2013). Clostridium Collagenases. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 607–611. doi:10.1016/b978-0-12-382219-2.00126-5.
28. Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2018). Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 43–55. doi:10.1016/j.bcab.2018.05.005.
29. Wanderley, M. C. de A., Neto, J. M. W. D., Filho, J. L. de L., Lima, C. de A., Teixeira, J. A. C., & Porto, A. L. F. (2017). Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 13–24. doi:10.1016/j.bjm.2016.08.001.
30. Hoa Bach, T. M., Pham, T. H., Dinh, T. S., & Takagi, H. (2020). Characterization of collagenase found in the nonpathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* VN3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1–10.

31. Pequeno, A. C. L., Arruda, A. A., Silva, D. F., Duarte Neto, J. M. W., Silveira Filho, V. M., Converti, A., Marques, D. A. V., Porto, A. L. F., & Lima, C. A. (2019). Production and characterization of collagenase from a new Amazonian *Bacillus cereus* strain. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 49(5), 501–509. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587627>.
32. Gautam, Manisha & Azmi, Wamik. (2017). Screening and Isolation of Collagenase Producing Microorganism from Proteins Waste Found in Himalayan Region. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 4. 558-565.
33. Zhu, Yaqing & Wang, Linlin & Zheng, Kaixuan & Liu, Ping & Li, Wenkang & Lin, Jian & Liu, Wenjing & Shan, Shoushui & Sun, Liqin & Zhang, Hailing. (2022). Optimized Recombinant Expression and Characterization of Collagenase in *Bacillus subtilis* WB600. *Fermentation*. 8. 449. [10.3390/fermentation8090449](https://doi.org/10.3390/fermentation8090449).
34. Xiao, H., Liu, X., Feng, Y. et al. (2022). Secretion of collagenases by *Saccharomyces cerevisiae* for collagen degradation. *Biotechnol Biofuels* 15, 89. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02186-y>.
35. Suphatharaprateep, Warinda & Cheirsilp, Benjamas & Jongjareonrak, Akkasit. (2011). Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. *New biotechnology*. 28. 649-55. [10.1016/j.nbt.2011.04.003](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.04.003).
36. Salih, Hanaa & I.Hussein, Sahar. (2022). ASSESSEMENT OF PURIFIED COLLAGENASE INHIBITION ACTIVITY FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* HN77 BY SOME LOCAL PLANTS EXTRACT. *IRAQI JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES*. 53. 1035-1047. [10.36103/ijas.v53i5.1617](https://doi.org/10.36103/ijas.v53i5.1617).
37. Al-Bedak, Osama & Moharram, Ahmed & Hussein, Nemmat & Taha, Doaa & Stephenson, Steven & Ameen, Fuad. (2023). Microbial Exploitation of Feather Wastes for Sustainable Production of Keratinase and Collagenase Enzymes by *Didymella keratinophila* AUMC 15399 in Submerged Fermentation. *Fermentation*. 9. 507. [10.3390/fermentation9060507](https://doi.org/10.3390/fermentation9060507).

38. Raftari, M., Ghafourian, S., Sadeghifard, N., & Bakar, F. A. (2013). *Cloning and Overexpression of Extracellular Elastase from Pseudomonas Aeruginosa*. *European Journal of Inflammation*, 11(1), 55–60. doi:10.1177/1721727x1301100106.
39. Lei, Yunlong & Zhao, Peipei & Li, Chenglei & Zhao, Haixia & Shan, Zhi & Wu, Qi. (2018). Isolation, identification and characterization of a novel elastase from *Chryseobacterium indologenes*. *Applied Biological Chemistry*. 61. 10.1007/s13765-018-0364-6.
40. AlShaikh-Mubarak, G. A., Kotb, E., Alabdall, A. H., & Aldayel, M. F. (2023). A survey of elastase-producing bacteria and characteristics of the most potent producer, *Priestia megaterium* gasm32. *PloS one*, 18(3), e0282963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282963>.
41. Патент на винахід № 97906. Штам *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 - продуцент позаклітинної еластази/ Мацелюх О. В., Варбанець Л.Д., Іваниця В.О. Опубл. 26.03.2012, Бюл. № 6.
42. Мала В.В., Белих І.А., Самойленко С.І. Удосконалення біотехнології одержання протеолітичних ферментів з використанням штаму *Bacillus licheniformis*// В кн.: Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології : збірник наукових праць. Випуск 6. – Харків : Вид-во НФаУ, 2019. – С. 300–301.
43. Патент України на винахід № 38270. Спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення/ Король Г. В., Волков Г. Л., Верьовка С. В. Опубл. 17.05.2004, Бюл. № 4.
44. Патент України на корисну модель № 62564. Штам бактерій *Bacillus* sp. ВС-1 – продуцент комплексу протеолітичних ферментів/ Білоусов І. В. Опубл. 12.09.2011, Бюл. № 17.
45. Ястребова О. В., Коробкова К. С. Фізико-хімічні властивості протеолітичного комплексу *Bacillus* spp. Науковий вісник Ужгородського

університету : Серія: Біологія. гол. ред. В.І.Комендар. Ужгород : Видавництво УЖНУ "Говерла", 2012, 33. – С. 174–178.

46. Хруленко О.С. Методи застосування ферментів у медичній практиці та тваринництві. Студентський науковий вісник [МНАУ]. 2017. 2 (10) : Сільськогосподарські науки. - С. 270-275.

47. Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Колагенолітичні ферменти мікроорганізмів. Біотехнологія. 2008, 1 (3): 13-23.

48. Романовська І.І., Декіна С.С. Розробка раневого гідрогелевого покриття з іммобілізованою лужною протеазою *Bacillus subtilis* на основі модифікованого полі-N-вінілпіролідону. Досягнення біології та медицини, 2007, 1: 88-91.

49. Gonçalves, Sara. (2021). Use of enzymes in cosmetics: proposed enzymatic peel procedure. *Cos ACTIVE J.* 1. 29-35.

50. López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of biological chemistry*, 283(45), 30433–30437.

51. Поліон, Н.М. and Дюдюн, А.Д. and Горбунцов, В.В. and Антипова, Ж.А. (2018) *Акне і акнеподібні дерматози*. Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология, 1-4. pp. 87-98.

52. Vidmar, B., & Vodovnik, M. (2018). Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 312–328. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5658>.

53. Haq, Ikram & Akram, Fatima. (2019). Striking Applications of Keratinase Enzyme Isolated from Various Natural Sources: A Review. 55. 1-17.

54. SMART-PEELING [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pbserum.com.ua/smapt-p%D1%96l%D1%96ng/>

55. Як змінилось лікування акне в Україні за 20 років 29.01.2024 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://milasbeauty.com/2024/01/29/yak-zminylosya-likuvannya-akne-v-ukrayini-protyagom-20-rokiv/>

56. Державна служба статистики України. Діти, жінки та сім'я в Україні 2022 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2022/zb/10/zb_djs_2022.pdf.

57. Місце пілінгів в лікуванні акне і постакне [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.pielcosmetics.com/articles/teoriya-kosmetologii/mistse-pilingiv-v-likuvanni-akne-i-postakne-/>

58. Пілінг Ензимний [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kaetana.shop/peeling/tproduct/559950937-798682497462-plng-enzimni>

59. Keratopeel (Кератиназа) 5 гр [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nataliza.zakupka.com/uk/p/279938992-keratopeel-keratinaza-5gr/>

60. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

61. Liaqat, I., Ali, S., Butt, A., Durrani, A. I., Zafar, U., Saleem, S., Naseem, S., & Ahsan, F. (2022). Purification and Characterization of Keratinase from *Bacillus licheniformis* dcs1 for Poultry Waste Processing. *Journal of oleo science*, 71(5), 693–700. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21426>.

62. Карлаш, Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.

63. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.

64. Конспект лекцій з курсу „Процеси та апарати хімічної технології”, розділ «Мембранні процеси» для студентів II-V курсів усіх спеціальностей / Укл.: О.О. Тертишний, О.В. Тертишна. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 79 с.

65. **Тодосійчук С.Р.** Біотехнологія солоду та ферментних препаратів: Курс лекцій для студ. спец. 6.091700 “Технологія бродильних виробництв і виноробства” ден. та заоч. форм навчання. – К.: НУХТ, 2008. – 90 с.

66. Технологія ліків промислового виробництва: Підруч. Для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III—IV рівнів акредитації /В. І.Чуєшов, Л. М.Хохлова, О. О. Ляпунова та ін.; За ред. В. І.Чуєшова —Х.:Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. — 720с.

67. Barla, R. J., Raghuvanshi, S., & Gupta, S. (2024). Reforming CO₂ bio-mitigation utilizing *Bacillus cereus* from hypersaline realms in pilot-scale bubble column bioreactor. *Scientific reports*, 14(1), 6354. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56965-8>.

68. 2,000 LITRE, ATMOSPHERIC INTERNAL, 3 BAR JACKET, STAINLESS STEEL VERTICAL FERMENTER VESSEL [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://perryvidex.eu/en/product/2000-ltr-bar-int-bar-jkt-agit-RG9905>

69. Відцентровий насос FL31CI [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://emerem.com.ua/industrial-pumps/hygienic-centrifugal-pumps/nasos-tipa-fl31ci/>.

70. 2000l/h Olive Oil 3 Phase Centrifuge Automatic Continuous 6250RPM [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.separator-centrifuge.com/sale-14415667-2000l-h-olive-oil-3-phase-centrifuge-automatic-continuous-6250rpm.html>

71. 8040 Ultrafiltration Membrane, 10,000 Dalton, for enzyme concentration [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://membrane.en.made-in-china.com/product/SFdtKvayMpAb/China-8040-Ultrafiltration-Membrane-10-000-Dalton-for-enzyme-concentration.html>.

72. Whatman® cation exchange cellulose [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com-UA/en/product/aldrich/z753718>

73. Pharmaceutical Lyophilization Machine Collagen Freeze Dry Equipment [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lyomacb19.en.made-in->

china.com/product/aFBGERbyCqcu/China-Pharmaceutical-Lyophilization-Machine-Collagen-Freeze-Dry-Equipment.html

74. Xianglu Manufacture Price 5 10 20 L 5L 10L 20L Liter Stainless Steel Jacketed Chemical Reactor for Sale [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Xianglu-Manufacture-Price-5-10-20_1601043529603.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.212460afRXGJqb

75. Suharti, Suharti & Rozaq, Hanif & Qisti, Aulia & Alvionita, Mieke & Wonorahardjo, Surjani. (2023). Keratinase Production by Bacillus sp. MD24 in Submerge and Solid State Fermentation. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 19. 460-470. 10.11113/mjfas.v19n3.3028.

76. Keratinase [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bestzyme.com/products/keratinase.html>

77. Cai, C. G., Lou, B. G., & Zheng, X. D. (2008). Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of Bacillus subtilis. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(1), 60–67. <https://doi.org/10.1631/jzus.B061620>.

78. K4519 Sigma-Aldrich Keratinase [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigma/k4519>.

79. Alamnie, Getachew & Gessesse, Amare & Bitew, Misganaw & Dawud, Nebiyu & Andualem, Berhanu & Girma, Abayeneh. (2023). Production and biochemical characterization of keratinase enzyme from Bacillus subtilis ES5 and its potential application in leather dehairing process: a clean leather tanning process. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 37. 10.1080/13102818.2023.2288691.

80. Салієва Л. М. Стандартизація лікарських засобів: конспект лекцій. Частина I. / Л. М. Салієва. – Луцьк: П “Зоря-плюс” ВОО ВОІ СОІУ, 2022. – 52 с.

81. Hay, Roderick & Bendeck, Sandra & Chen, Suephy & Estrada, Roberto & Haddix, Anne & McLeod, Tonya & Mahé, A.. (2006). Skin Diseases. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11733/>.

82. Ebrahimnejad, Niki & Goodarzi, Heidi. (2023). The Past, Present, Future: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Human Skin Diseases. 10.20944/preprints202312.0052.v1.
83. Szymańska, A., Budzisz, E., & Erkiert-Polguj, A. (2021). Efficacy of 30% azelaic acid peel in the nonpharmacological treatment of facial acne. *The Journal of dermatological treatment*, 32(3), 291–296. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1657222>
84. Starkman, S. J., & Mangat, D. S. (2020). Chemical Peel (Deep, Medium, Light). *Facial plastic surgery clinics of North America*, 28(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2019.09.004>
85. O'Connor, A. A., Lowe, P. M., Shumack, S., & Lim, A. C. (2018). Chemical peels: A review of current practice. *The Australasian journal of dermatology*, 59(3), 171–181. <https://doi.org/10.1111/ajd.12715>
86. SkinTra - Pink Pow(d)er - Багатофункціональна очищувально-ензимна пудра на основі глини - 40g [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosibella.com.ua/uk/products/skintra-21379>
87. Samargandy, S., & Raggio, B. S. (2023). Chemical Peels for Skin Resurfacing. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
88. Elever Cosmetics - Panapi - Ензимний пілінг для обличчя - 20g [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosibella.com.ua/uk/products/elever-cosmetics-18125>
89. Тофра - Розгладжуючий ензимний пілінг для обличчя - Dermo Face Enzyme - 40ml [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosibella.com.ua/uk/products/tolpa-3993>
90. Types of Cosmetic Packaging [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://somewang.com/blog/types-of-cosmetic-packaging/>
91. Медичне та фармацевтичне товаровознавство : підручник для студентів вищ. навч. закладів / І. І. Баранова, С. М. Коваленко, Ю. О. Безпала, Т. В. Дядюн, С. О. Мамедова. — Х. : НФаУ : Оригінал, 2016. — 304 с.

92. Always the optimal material for a good idea [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.etma-online.org/tubetypes.html>
93. Ензимний гель-пілінг для обличчя [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://yuka.ua/enzimnyy-gel-piling-dlya-litsa/>
94. Łętocha, Anna & Miastkowska, Małgorzata & Sikora, Elzbieta. (2022). Preparation and Characteristics of Alginate Microparticles for Food, Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Polymers*. 14. 10.3390/polym14183834.
95. Camargo, F. B., Jr, Gaspar, L. R., & Maia Campos, P. M. (2011). Skin moisturizing effects of panthenol-based formulations. *Journal of cosmetic science*, 62(4), 361–370.
96. Nilforoushzadeh, M. A., Amirkhani, M. A., Zarrintaj, P., Salehi Moghaddam, A., Mehrabi, T., Alavi, S., & Mollapour Sisakht, M. (2018). Skin care and rejuvenation by cosmeceutical facial mask. *Journal of cosmetic dermatology*, 17(5), 693–702. <https://doi.org/10.1111/jocd.12730>
97. Glycerin For Face: The Wonder Ingredient You Need Right Away! [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://skinkraft.com/blogs/articles/glycerin-for-face>
98. Folle, C., Marqués, A. M., Díaz-Garrido, N., Carvajal-Vidal, P., Sánchez López, E., Suñer-Carbó, J., Halbaut, L., Mallandrich, M., Espina, M., Badia, J., Baldoma, L., García, M. L., & Calpena, A. C. (2024). Gel-Dispersed Nanostructured Lipid Carriers Loading Thymol Designed for Dermal Pathologies. *International journal of nanomedicine*, 19, 1225–1248. <https://doi.org/10.2147/IJN.S433686>.
99. AMMONIUM ACRYLOYLDIMETHYLTAURATE/VP COPOLYMER [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/ammonium-acryloyldimethyltaurate-vp-copolymer#:~:text=Ammonium%20acryloyldimethyltaurate%2FVP%20copolymer%20helps,%2C%20thickener%2C%20and%20texture%20enhancer.>

100. Safety Assessment of Acryloyldimethyltaurate Polymers as Used in Cosmetics [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/ACTAPY092016TR%20-%20final.pdf>
101. BENZYL ALCOHOL [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/benzyl-alcohol#:~:text=Benzyl%20Alcohol%20has%20antimicrobial%20properties,lotions%2C%20creams%2C%20and%20makeup.>
102. DEHYDROACETIC ACID [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/dehydroacetic-acid>
103. Вишневська, Л. І. Розробка складу та технології комбінованого гелю з рослинними екстрактами / Л. І. Вишневська, В. В. Постой // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2019. – № 1 (57). – С. 4-10. doi : 10.24959/uekj.19.8
104. Ваги бункерні «Норма-ТН» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://simo.com.ua/ua/obladnannya/vesi-bunkernie-norma-tn>
105. Реактор для сиропів РС-1000 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-siropov-rs-1000/>
106. Кулачкові насоси серії DW [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ascopumps.com.ua/ua/equipment/gigienicheskie_nasosy/kulachkovye_nasosy_serii_dw.html
107. Реактор РГС 50 л GMP [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-rgs-50-l-gmp/>
108. Бочкові гвинтові насоси для густих, в'язких рідин [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/vintovyye_nasosy/
109. Hydrophobic Durapore® 0.22 µm Cartridge Filters [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Hydrophobic-Durapore-0.22-m-Cartridge-Filters,MM_NF-C534?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#overview

110. Реактор для МЛФ РСДП-500 ВК [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-mlf-rsdp-500-vk/>

111. Multilayer Durapore® 0.45/0.22 µm Cartridge Filters [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Multilayer-Durapore-0.45-0.22-m-Cartridge-Filters,MM_NF-C8848?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#specifications

112. Гомогенізатор роторний ГРП-120 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/gomogenizator-rotornyj-grp-120-peredvizhnoj/>

113. Автомат АТЛ для фасування в ламінатні труби [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://inta.org.ua/avtomat-atl-dlya-fasovki-v-laminatnye-tuby.html>

114. Горизонтальна картонажна машина крокового типу Вох 60Н Nomatech [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://gvp.com.ua/ua/goryzontalna-kartonazhna-mashyna-krokovogo-typu-box-60h-nomatech>

115. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З ДИСЦИПЛІНИ «ХІМІЯ ТА ТЕХНОЛОГІЯ КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ» [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://udhtu.edu.ua/wp-content/uploads/2022/07/bak_161_mv_lr_htkz.pdf

116. Hua Y., Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(2):195–208.

117. Cesarman-Maus, G., & Hajjar, K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology*, 129(3), 307–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>

118. Патент України на винахід № 38270. Спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів для внутрішньосудинного введення/ Король Г. В., Волков Г. Л., Верьовка С. В. Опубл. 17.05.2004, Бюл. № 4.