

**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)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« 08 » грудня 2025 р.

« 08 » грудня 2025 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: «Термофільні бактерії роду *Geobacillus* як об'єкти біотехнології»

Виконав: здобувач II курсу, групи ПФБ-2-1М

ВАСИЛЬЄВА Олександра Леонідівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Інна ЧЕПАРСЬКА

(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) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 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

“ 01 ” жовтня 2025 року

З А В Д А Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВАСИЛЬЄВОЇ Олександрі Леонідівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Термофільні бактерії роду *Geobacillus* як об'єкти біотехнології

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 912-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 грудня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи: Термофільні бактерії роду *Geobacillus*.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РЕФЕРАТ, ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ЗМІСТ, ВСТУП, РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА МЕТАБОЛІТИ БАКТЕРІЙ РОДУ *GEOBACILLUS*, РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ НАПРЯМИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *GEOBACILLUS*, РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ, РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ, РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ, РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КРЕМУ, РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА, РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ, ВИСНОВКИ, СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ,

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема біосинтезу ліпази Lip7 – 1, формат аркушу А1,

Технологічна схема біосинтезу ліпази Lip7 – 1, формат аркушу А1,

Апаратурна схема біосинтезу наночастинок срібла – 1, формат аркушу А1,

Технологічна схема біосинтезу наночастинок срібла – 1, формат аркушу А1,

Апаратурна схема виробництва CAPE та крему – 1, формат аркушу А1,
Технологічна схема біосинтезу CAPE та крему – 1, формат аркушу А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Біологічні особливості та метаболіти бактерій роду <i>Geobacillus</i>	01.10.25 – 17.10.25	
2	Сучасні напрями біотехнологічного застосування бактерій роду <i>Geobacillus</i>	18.10.25 – 25.10.25	
3	Техніко економічне обґрунтування	26.10.25 – 06.11.25	
4	Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	07.11.25 – 10.11.25	
5	Опис технологічної схеми	11.11.25 – 15.11.25	
6	Технологічні особливості отримання крему	16.11.25 – 19.11.25	
7	Контроль виробництва	20.11.25 – 22.11.25	
8	Проект заявки на корисну модель	23.11.25– 25.11.25	
9	Графічна частина роботи	26.11.25 – 28.11.25	
10	Оформлення роботи	29.11.25 – 30.11.25	

Здобувач _____
(підпис)

Олександра ВАСИЛЬЄВА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Оксана СКРОЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

У кваліфікаційній роботі представлена комплексна розробка технологічної та апаратурної схем післяферментаційних етапів одержання ферменту ліпаза (Lip7) та синтезу наночастинок срібла (AgNPs) за допомогою термофільних бактерій роду *Geobacillus*. Дана робота зосереджена на розробці та отриманні термостабільної ліпази для застосування у косметичній промисловості у якості каталізатора реакції естерифікації для синтезу фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE). Та використання даного продукту синтезу разом з наночастинками срібла у якості основних активних компонентів у протизапальних засобах для проблемної шкіри.

Виробництво ліпази (Lip7) базується на рекомбінантній експресії генів *Geobacillus* sp. ID17 у *E.coli* C41(DE3). Отриманий термолужний фермент, досягає максимальної активності (3350 ОД мг⁻¹ при максимальному очищенні) при 50 °С і рН 11, та зберігає активність до 60 °С при рН 8. Також залишаючись стабільним у присутності органічних розчинників. А за допомогою супернатанту *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1 та 1 мМ AgNO₃ отримуються сферичні AgNPs, розміром 1,4-16,3 нм, що відзначаються потужною антимікробною та протигрибковою активністю.

Розроблено апаратурні та технологічні схеми отримання ліпази (Lip7) та наночастинок срібла, схеми процесу отримання фенетилового ефіру кавової кислоти за допомогою Lip7, та виготовлення крему за використання AgNPs та CAPE у якості основних компонентів.

Кваліфікаційна робота представлена 122 сторінками, містить 8 рисунків, 15 таблиць. До складу роботи входять вступ, 8 розділів, список використаної літератури (158 найменувань). Графічна частина складається з апаратурних схем (3 аркуши, формату А1) та технологічних схем (3 аркуши, формату А1).

Ключові слова: *Geobacillus* sp. ID17, ліпаза Lip7, рекомбінантна експресія, CAPE, *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1, наночастинки срібла, виділення та очистка, дерматокосметичний крем.

ABSTRACT

This qualification work presents a comprehensive development of the technological and device schemes for the post-fermentation stages of obtaining the Lip7 lipase enzyme and synthesising silver nanoparticles (AgNPs) using thermophilic bacteria of the *Geobacillus* genus. The work focuses on the development and production of thermostable lipase for use in the cosmetics industry as a catalyst for the esterification reaction in the synthesis of phenethyl ester of coffee acid (CAPE). The use of this product in combination with silver nanoparticles as the main active ingredients in anti-inflammatory products for problem skin is also explored.

The production of lipase (Lip7) is based on the recombinant expression of *Geobacillus* sp. ID17 genes in *E. coli* C41(DE3). The resulting thermoalkaline enzyme reaches maximum activity (3350 U/mg at maximum purification) at 50 °C and pH 11, and retains activity up to 60 °C at pH 8. It also remains stable in the presence of organic solvents. Supernatant from *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1 and 1 mM AgNO₃ is used to produce spherical AgNPs, measuring 1.4–16.3 nm, which exhibit powerful antimicrobial and antifungal activity.

The device and technological schemes for obtaining lipase (Lip7) and silver nanoparticles, as well as the process for obtaining phenethyl ester of coffee acid using Lip7 and the manufacture of cream using AgNPs and CAPE as the main components have been developed.

The qualification work is presented in 122 pages and contains 8 figures and 15 tables. The work includes an introduction, eight chapters, a list of references (158 items). The graphic part consists of device scheme (3 sheets, A1 format) and technological scheme (3 sheets, A1 format).

Keywords: *Geobacillus* sp. ID17, Lip7 lipase, recombinant expression, CAPE, *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1, silver nanoparticles, isolation and purification, dermatocosmetic cream.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

EPS (Exopolysaccharides) – Екзополісахариди;

ПАР – Поверхнево-активні речовини;

AgNPs (silver nanoparticles)– Наночастинки срібла;

AuNPs – Наночастинки золота;

SeNPs – Наночастинки селену;

CAPE (Caffeic acid phenethyl ester) – Фенетиловий ефір кавової кислоти;

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я;

АД – Атопічний дерматит;

КТ – Контактний дерматит;

PEF (Pulsed electric field) – Технологія імпульсного електричного поля;

AgNPs – Наночастинки срібла;

SPR (Surface plasmon resonance) – Поверхневий плазмонний резонанс;

PCS (Photon correlation spectroscopy) – Метод фотонно кореляційної спектроскопії;

DLS (Dynamic light scattering) – Метод динамічного розсіювання світла;

ТЕМ (Transmission electron microscope) – Трансмісійна електронна мікроскопія;

FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) – Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ЗМІСТ	7
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА МЕТАБОЛІТИ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>GEOBACILLUS</i>	13
1.1. Ферментативний потенціал.....	14
1.2. Біосинтез екзополісахаридів	19
1.3. Синтез поверхнево-активних речовин та біосурфактантів.....	23
РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ НАПРЯМИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>GEOBACILLUS</i>	26
2.1. Біосинтез наночастинок.....	26
2.2. Біосинтез бактеріоцинів та бактеріоциноподібних сполук	31
2.3. Біотехнології рекомбінантних сполук	34
2.4. Висновки	42
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	44
3.1. Характеристика та використання рекомбінантних ліпаз як інноваційного біокатализатора.....	44
3.2. Запальні захворювання шкіри в Україні: статистика та ринок спеціалізованих доглядових засобів	47
3.2.1 Оцінка рівня поширення запальних шкірних хвороб в Україні.....	47
3.2.2 Аналіз сучасних косметичних засобів, що застосовуються при запальних ураженнях шкіри.....	50
3.2.3 Ферментативний синтез фенетилового ефіру кавової кислоти та його перспективи у дерматокосметології.....	52
3.3. Розрахунок річної потужності виробництва	53
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	59

4.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	59
4.1.1 Підбір обладнання для лінії отримання ліпази Lip7	59
4.1.2 Підбір обладнання для лінії отримання наночастинок срібла	61
4.2. Специфікація обладнання.....	62
4.2.1 Специфікація обладнання для лінії отримання ліпази Lip7	62
4.2.2 Специфікація обладнання для лінії отримання наночастинок срібла ..	63
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	66
5.1. Опис технологічної схеми процесу виділення та очищення ліпази Lip7.....	66
5.2. Опис технологічної схеми процесу виділення та очищення наночастинок срібла	70
РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КРЕМУ	74
6.1. Обґрунтування обрання форми та упаковки.....	74
6.2. Обґрунтування технологічних особливостей отримання крему.....	75
6.2.1 Технологія отримання фенетилового ефіру кавової кислоти за допомогою рекомбінантної іммобілізованої ліпази (Lip7).....	75
6.2.2 Обґрунтування використання допоміжних речовин у кремі для проблемної шкіри.....	77
6.3. Матеріальний розрахунок та орієнтовні норми витрат на серію виробництва крему.....	79
6.4. Специфікація обладнання.....	80
6.5. Опис технологічної схеми отримання крему для проблемної шкіри	81
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	85
7.1. Методи контролю виробництва ліпази Lip7 та наночастинок срібла	85
7.1.1 Контроль активності ліпази	85
7.1.2 Контроль характеристик наночастинок срібла	87
7.2. Контроль якості крему для проблемної шкіри.....	92
РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ.....	94
8.1. Проект заявки на корисну модель. Спосіб отримання фенетилового ефіру кавової кислоти.....	94

8.1.1	Опис корисної моделі	94
8.1.2	Реферат до деклараційного патенту	96
8.1.3	Формула корисної моделі.....	96
8.2.	Проект заявки на корисну модель. Спосіб отримання біогенних наночастинок срібла.....	97
8.2.1	Опис корисної моделі	97
8.2.2	Реферат до деклараційного патенту	99
8.2.3	Формула корисної моделі.....	99
	ВИСНОВКИ.....	101
	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.	102
	ДОДАТКИ.....	122

ВСТУП

Термофільні бактерії роду *Geobacillus* викликають особливий інтерес у дослідників завдяки своїм унікальним фізіологічним і біохімічним властивостям, які дають можливість використовувати їх у біотехнології. Вони можуть виживати і функціонувати в суворих умовах навколишнього середовища, включаючи високу температуру, низький рівень поживних речовин, високий тиск і значні коливання кислотності середовища. Термостабільні ферменти, екзополісахариди, сурфактанти, наночастинки, бактеріоцини, бактеріоциноподібні сполуки, синтезовані та рекомбінантні продукти, отримані шляхом експресії модельних мікроорганізмів, що несуть геном бактерій *Geobacillus*, мають широкий потенціал для застосування у фармацевтичній, хімічній, харчовій, текстильній та косметичній промисловості (Hussein, Lisowska, & Leak, 2015; Chauhan, Fatima, Verma, & Sharma, 2024; Aytar, Başbülbul, & Uygun, 2024; Özdemir, Orhan, Atasavum & Tülek, 2022).

Запальні захворювання шкіри становлять значне і зростаюче навантаження на світову систему охорони здоров'я, впливаючи на якість життя мільйонів людей по всьому світу (Duda, & Okhotnikova, 2018; Kim, & Kim, 2024). В Україні дерматози широко розповсюджені і мають тенденцію до зростання, оскільки вплив як екзогенних (зовнішніх), так і ендогенних (внутрішніх) чинників, що їх спричиняють, щороку посилюється (Melnyk та ін., 2022). За офіційними даними Міністерства охорони здоров'я України, в 2005 році загальна захворюваність на хвороби шкіри та підшкірної клітковини становила близько 4866,3 випадків на 100 тис. населення. Аналітичні дослідження показують значне зростання поширеності atopічного дерматиту (на 69,7%), а також псоріазу (на 46,5%) у період 2001-2011 років (Волкославська, Гутнєв, 2013). Постійна та прогресуюча глобальна проблема зі здоров'ям шкіри має значний вплив на якість життя, що підкреслює нагальну потребу в розробці нових ефективних терапевтичних та профілактичних рішень.

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Васильсва О.Л.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скряцька О.І.					10	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Український ринок косметичних засобів для проблемної шкіри є насиченим та конкурентним, пропонуючи різноманітні бренди та лінійки для лікування дерматозів. Основні компоненти цих засобів включають такі інгредієнти, що мають протизапальну, регулюючу або антибактеріальну дію, зволожуючий, відлущуючий або відновлюючий ефекти – це різні кислоти (азелаїнова, саліцилова, гліколева, молочна, гіалуронова), ретиноїди, ніацинамід (вітамін В3), цинк, пантенол, алантоїн, олії, глини тощо. Проте, попри таку насиченість, глобальний ринок демонструє потенціал для значного зростання, зумовленого підвищенням обізнаності споживачів, зростанням поширеності шкірних захворювань, попитом на натуральні та органічні продукти, а також постійним удосконаленням косметичних формул.

В цьому контексті біотехнологія пропонує унікальні можливості для розробки цільових функціональних інгредієнтів з підвищеною біосумісністю та зниженим впливом на довкілля, що відповідає тенденціям «чистої краси» та попиту на персоналізований догляд за шкірою. Проект, що розглядається, зосереджений на використанні термофільних бактерій роду *Geobacillus* як продуцентів ключових біокатализаторів та наночастинок. Дані характеристики безпосередньо пов'язані з здатністю бактерій виробляти високо термостабільні ферменти. Ліпаза Lip7, отримана шляхом рекомбінантної експресії генів *Geobacillus* sp. ID17 у *Escherichia coli* C41 (DE3), є термолужним ферментом, що є надзвичайно перспективним біокатализатором для промислових застосувань. Її властивості є критичними для багатьох промислових процесів, які вимагають підвищених температур та залучення органічних розчинників (Salas-Bruggink, Guzmán, Espina, & Blamey, 2024).

Наночастинки срібла (AgNPs) біосинтезовані за допомогою *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 є сферичними, розміром від 1,4 до 16,3 нм, і саме тому проявляють потужну антимікробну та протигрибкову активність (Youssif, Soliman, Sabry, & Ghozlan, 2020).

Центральною інновацією роботи є розробка косметичного крему, спеціально призначеного для проблемної та запаленої шкіри. Крем поєднує два ключові

активні компоненти: фенетиловий ефір кавової кислоти (CAPE), синтезований за допомогою каталізу реакції термостабільною ліпазою Lip7, та наночастинки срібла. CAPE є біоактивною сполукою, відомою своїми протизапальними, антиоксидантними та противірусними властивостями (Tripon, Tulcan, Marc, Camen, & Paul, 2025). Запальні стани шкіри часто є багатофакторними, включаючи мікробний дисбіоз, хронічне запалення та окислювальний стрес. Стратегічне поєднання CAPE та AgNPs у косметичній формулі забезпечує комплексний, багатоцільовий підхід. CAPE безпосередньо впливає на каскад запальних реакцій та окислювальне пошкодження, тоді як AgNPs ефективно борються з мікробною проліферацією, підвищуючи довгострокову ефективність продукту та його актуальність в епоху зростаючої антимікробної резистентності. Цей інноваційний дует є значним кроком вперед у дерматокосметології, який надає потужне та інтегроване рішення для складних проблем шкіри, підвищуючи ефективність лікування та покращуючи його результати.

Новизною даної роботи є розробка технології отримання рекомбінантної ліпази Lip7 та наночастинок срібла для подальшого ферментативного синтезу фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE). Вперше запропоновано поєднання цих біотехнологічних продуктів у рецептурі косметичного крему, що забезпечує одночасно протизапальний та антибактеріальний ефект

РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА МЕТАБОЛІТИ БАКТЕРІЙ РОДУ *GEOBACILLUS*

Термофільні мікроорганізми - це мікроорганізми, які розвиваються в високотемпературному середовищі, зазвичай 41-122°C, з температурним оптимумом 48-80°C. В широкому розумінні, термофіли - це мешканці геотермальних районів, де є тепло земних надр, наприклад морські гарячі джерела, гейзери, вулкани, а також нафтові резервуари, компост та інші високотемпературні прошарки Землі (Najar, & Thakur, 2020).

Geobacillus – це рід бактерій, який класифікується в родині *Bacillaceae*, класі *Bacilli*, типу *Firmicutes* і вперше з'явився після перекласифікації видів роду *Bacillus* у 2001 році (Oren, & Garrity, 2017). Морфологічно, вони являють собою прямі палички, розміром 0,5-2,5×1,2-10 мкм, завдовжки 1,5-3 мкм, які можуть розташовуватися поодинокі або короткими ланцюжками (рис.1.1). Це паличкоподібні, грам-позитивні бактерії, які характеризуються здатністю утворювати ендоспори, аеробні або факультативно анаеробні, оптимальна температура росту яких 37-75°C. Здатність до спороутворення надала представникам роду *Geobacillus* екологічної переваги – уміння виживати в несприятливих умовах протягом тривалого часу, звідки їх ізолювали для ретельного вивчення (Logan, Vos, & Dinsdale, 2015; Najar, & Thakur, 2020).

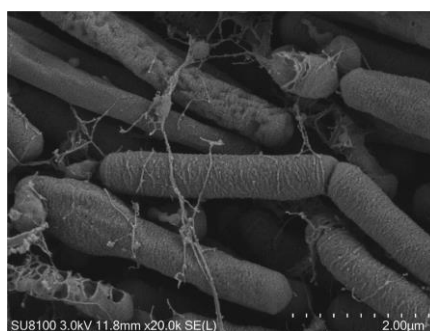


Рис. 1.1 Електронна мікрофотографія штаму *Geobacillus thermodenitrificans* DC8 (Logan, Vos, & Dinsdale, 2015; Najar, & Thakur, 2020)

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА МЕТАБОЛІТИ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>GEOBACILLUS</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		<i>Васильєва О.Л.</i>					13	127
Перевір.		<i>Скряцька О.І.</i>				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

Бактерій роду *Geobacillus* дуже цікаві для досліджень, адже їх біологічна роль надзвичайно різноманітна, а їх метаболічний потенціал дозволяє адаптуватися до різноманітних екологічних ніш. Завдячуючи своїм властивостям вони відіграють важливу роль в біотехнологічній науці та мають широке промислове застосування (Hussein, Lisowska, & Leak, 2015).

1.1 Ферментативний потенціал

Виняткові ферментативні можливості бактерій роду *Geobacillus*, зокрема здатність синтезувати стабільні ферменти в найнесприятливіших умовах, завжди привертала увагу вчених (Таблиця 1.1). Такі синтезовані ферменти, як ліпази, амілази, ксиланази, протеази та інші зберігають свою активність при високих температурах, висушуванні, радіації, ультрафіолетовому випромінюванні, під дією хімічних агентів тощо (Jeon, та ін, 2016; Arya, Chauhan, Fatima, Verma, & Sharma, 2024; Rajashekarappa, & Kumar, 2024; Sania, та ін., 2024; Kumar, та ін., 2024). Ці особливості ферментів роблять їх надзвичайно цінними в багатьох промислових галузях (наприклад, виготовлення побутової хімії, біопалива, продуктів харчування, фармацевтичних засобів тощо) (Cha, & Chambliss, 2013; Sürmeli, Tekedar, & Şanlı-Mohamed, 2024).

У науковому дослідженні Abol-Fotouh, AlHagar, & Hassan (2021) було проаналізовано можливість оптимізації умов виробництва та очищення завдяки біохімічним характеристикам термоалкаліфільної ліпази, яку було отримано за допомогою штаму *Geobacillus stearothermophilus* FMR12. Вченими було встановлено, що оптимальними умовами для ферментативної активності *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 є температура 70°C та pH 9.0. В середовищі, де були присутні детергенти, органічні розчинники та іони металів, ферментована ліпаза проявила значну активність. Це підтвердило доречність її використання в миючих засобах: підвищена ефективність видалення жиру на текстилі.

Також, досліджувалися ліпази з термічно оброблених клітинних лізат бактерій *Geobacillus stearothermophilus* і *Anoxybacillus flavithermus*. Ліпаза, синтезована *G. Stearothermophilus* виявила термостабільність до 70°C в умовах лужного середовища та толерантність до органічних розчинників і поверхнево-

активних речовин (Najm, & Walsh, 2022). Обидва дослідження продемонстрували потенціал ліпаз, що були синтезовані термостабільними бактеріями роду *Geobacillus* для біокаталізу, в промислових умовах, де потрібна висока ферментна стабільність.

Оптимізація умов для збільшення виробництва протеази синтезованої *Geobacillus* SBS-4S було проведено в дослідженнях Ahmad та ін. (2020). Фермент залишався максимально активним при температурі 70°C і pH 8.0. Було заявлено про стабільність протеази серед різних металів та органічних розчинників і ефективність у розчепленні білків з промислових відходів. Ці властивості довели потенціал протеази у сфері біоутилізації (процесах переробки органічних залишків) та сільському господарстві (виробництво кормів).

Серинову протеазу, синтезовану штамом *Geobacillus* sp. GS53 було охарактеризовано в іншому дослідженні. В присутності поверхнево-активних речовин, органічних розчинників та окислювачів, в широкому діапазоні pH (4.7-10) протеаза зберігала свою активність. До того ж, була термостабільною при 85°C, з оптимальною температурою активності 55°C (Baykara, Sürmeli, & Şanlı-Mohamed, 2021).

Нову термостабільну ксиланазу, отриману шляхом синтезу *Geobacillus vulcani* GS90 охарактеризували вчені Algan, Sürmeli, & Şanlı-Mohamed (2021). В результаті своїх досліджень вони отримали високу активність даного ферменту для покращення харчових властивостей фруктових соків – якість яблучного і апельсинового соків була підвищена в їх органолептичних показниках та освітленні.

Bukhari, Bibi, Ullah, & Rehman (2024) провели дослідження ґрунту: виділено мікробні ізоляти та проведено ідентифікацію бактерій. Серед усіх мікроорганізмів було виявлено бактерію, штаму *Geobacillus stearothermophilus* ADM-11, який був використаний для біосинтезу термостабільної пуллуланизи (рис. 1.2). Ферментована пуллуланиза залишалася активною при температурі 70°C та pH 6.5 та після тривалого нагрівання до 90°C. Після очищення фермент в десять разів збільшив свою активність до 375 Од/мл. Поза тим, пуллуланиза мала високу

специфічність до субстрату та ефективно гідролізувала як пуллулан, α -глюканові полісахариди і амілопектин. Важливим кроком в дослідженні стало успішне клонування гена пуллуланази, що в перспективі уможливило його масове виробництво.

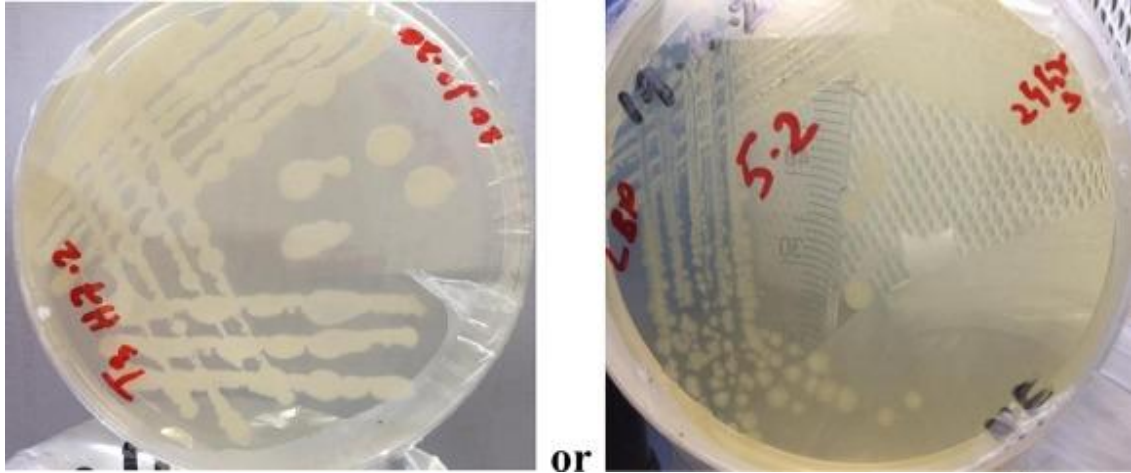


Рис 1.2 Колонії *Geobacillus stearothermophilus* ADM- 11 після 24 годин росту на пуллулан-агаровому середовищі (Bukhari, Bibi, Ullah, & Rehman, 2024)

Характеристика ферментів синтезованих бактеріями роду *Geobacillus*

Штам	Умови культивування (джерело вуглецю та азоту, г/л)	Фермент	Активність, Од/мл	Сфера застосування	Джерело
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> FMR12	65°C, 150 об/хв, рН 9 ± 0,2, 24 год (дріжджовий екстракт- 1, NaNO ₃ -2, висушені рибні відходи-10)	Ліпаза	1038 (в культуральній рідині)	Виробництво мийних засобів	Abol-Fotouh, AlNagar, & Hassan, 2021
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	55°C, 100 об/хв, 24 год (казеїновий пептон-17, соєвий пептон-3, глюкоза-2,5)	Ліпаза	До термічної обробки-37,67 Після термічної обробки-42,91 (в лізаті клітин)	Харчова промисловість	Najm, & Walsh, 2022
<i>Geobacillus</i> SBS-4S	60°C, 120 об/хв, 18 год (дріжджовий екстракт-20, пшеничні висівки-50)	Протеаза	34,5 (очищений фермент)	Комбікормова промисловість	Ahmad та ін., 2020

Закінчення табл. 1.1

<i>Geobacillus</i> sp. GS53	55°C, 200 об/хв, рН 7 ± 0,2, 24 год (глюкоза-10, дріжджовий екстракт-5, пептон-2,5, казеїн-2,5)	Протеаза	137,8 ± 7,2 (очищений фермент)	Виробництво мийних засобів	Baykara, Sürmeli, & Şanlı-Mohamed, 2021
<i>Geobacillus</i> <i>vulcani</i> GS90	55°C, 200 об/хв, 12 год (ксилан букового дерева-10, триптон-20, дріжджовий екстракт-2,5, NH ₄ NO ₃ -2)	Ксиланаза	431,1 ± 5,1 (очищений фермент)	Виготовлення соків, агропромисловість	Algan, Sürmeli, & Şanlı- Mohamed, 2021
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> ADM-11	37°C, 200 об/хв, 18 год (пептон-20, дріжджовий екстракт-10)	Пулуланаза	375 (очищений фермент)	Харчова промисловість	Bukhari, Bibi, Ullah, & Rehman, 2024

1.2. Біосинтез екзополісахаридів

Мікробні екзополісахариди є високомолекулярними полімерами, отриманими мікроводоростями, дріжджами, пліснявими грибами, грибами та бактеріями. Вони можуть накопичуватися поза клітиною як капсульні ЕПС або вивільнятися в навколишнє середовище (Karadayı та ін., 2021). Завдяки своїм унікальним біологічним властивостям (антиоксидантна, імуностимулююча, протиракова, протівірусна або протипухлинна активність) ці сполуки, синтезовані бактеріями, часто використовуються в багатьох медичних галузях (Moscovici, 2015). Синтез ЕПС бактеріями роду *Geobacillus* є дуже привабливим завдяки високій термостійкості бактерій (метаболітів) та відсутності забруднення мезофілами, зменшенню в'язкості рідкого середовища з підвищенням температури та високій здатності до зростання, а також, завдяки непатогенній природі та екологічній безпеці (Таблиця 1.2). Саме ці особливості впливають на значущість ЕПС для розширення їх використання в біотехнологічній та фармацевтичній промисловості (наприклад, доставка ліків, медична діагностика, біорозкладні пластики тощо) (Aytaç, Başbülbul, & Uygun, 2024; Arena, 2009).

У Kambourova та ін. (2009) вивчався позаклітинний біосинтез мікробного глюкану бактерією *Geobacillus tepidamans* V264. Синтезований ЕПС мав високу молекулярну масу, демонстрував відмінну стабільність при високій температурі та розкладався при 280°C. Це говорить про його придатність для використання у високотемпературних промислових процесах.

В подальшому, проводилися дослідження синтезу ЕПС з штамів *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 та *Geobacillus toebii* ArzA-8. Біосинтез відбувався за різної тривалості, температури та умов середовища. Отримані ЕПС мали кілька значущих хімічних характеристик, антиоксидантну активність та перспективний потенціал для медичних і фармацевтичних застосувань. Уронова кислота, знайдена в складі ЕПС, також відкриває шлях для їх використання в косметичці враховуючи її зволожуючі властивості (Panosyan, Di Donato, Poli, & Nicolaus, 2018).

У одному з досліджень, проведеному Wang, Salem, & Sani (2021), були описані два нових екзополісахариди, синтезовані бактерією *Geobacillus sp.* WSUCF1. Екстраговані ЕПС демонстрували антиоксидантну активність та

максимальну міцність деградації у порівнянні з іншими термофільними ЕПС. В іншій роботі було досліджено синтез біополімерів *Geobacillus sp.* WSUCF1 з використанням сирії кукурудзяної соломи як джерела вуглецю. Отримані ЕПС мали високу термостійкість, біосумісність та антиоксидантні властивості. (Wang, Salem, & Sani, 2020).

Екзополісахарид, вироблений штамом *Geobacillus sp.* TS3-9, раніше розглядався у його ізоляції з радіоактивного гарячого джерела. ЕПС мав унікальну хімічну структуру, являв значну антиоксидантну активність та імуностимулюючу особливість. Ранні дослідження *in vitro* показали, що ЕПС значно інгібував (стримував) проліферацію клітин гепатоцелюлярної карциноми (форма первинного раку печінки).

Серед органічних компонентів з антиоксидантними ефектами природні полісахариди викликають особливий інтерес, оскільки можуть слугувати альтернативою синтетичним антиоксидантам з небажаними побічними ефектами для запобігання нейрональної дегенерації (Wang, et al., 2017).

Особливості біотехнології та біологічна активність екзополісахаридів бактерій роду *Geobacillus*

Штам	Умови культивування (джерело вуглецю та азоту, г/л)	Концентрація ЕПС у культуральній рідині, г/л	Біологічна дія, ефективна концентрація ЕПС, мг/мл	Джерело
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ArzA-6	65°C, 240 об/хв, рН 7 ± 0,2, 18 год (глюкоза-6, дріжджовий екстракт-0,2, пептон-0,1)	0,07	-	Panosyan, Di Donato, Poli, & Nicolaus 2018
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	60°C, 180 об/хв, 24 год (-)	0.52	Антиоксидантна активність, нецитотоксичність для НЕК-293 клітин 2 мг/мл	Wang, Salem, & Sani, 2021
<i>Geobacillus</i> sp. TS3-9	55°C, 150 об/хв, рН 8 ± 0,2, 24 год (глюкоза-20, (NH ₄) ₂ SO ₄ -0,1, дріжджовий екстракт-0,1)	0,08	Інгібуюча дія на проліферацію НерG2 (коефіцієнт інгібування НерG2 від 2,2% до 16,9%) 4 мкг/мл	Wang та ін., 2017
<i>Geobacillus tepidamans</i> V264	60°C, 300 об/хв, рН 7 ± 0,2, 12 год (мальтоза-3, (NH ₄) ₂ HPO ₄ -0,3)	0,05	Антицитотоксична сполука, підвищення значення LD50 аваролу в 12 разів (0,18 до 2,24 мкг/мл)	Kambourov та ін., 2009

<i>Geobacillus toebii</i> ArzA-8	65°C, 240 об/хв, рН 7 ± 0,2, 18 год (сахароза-6, дріжджовий екстракт-0,2, пептон-0,1)	0,08	-	Panosyan, Di Donato, Poli, & Nicolaus 2018
<i>Geobacillus sp.</i> strain WSUCF1	60°C, 180 об/хв, рН 7 ± 0,2, 24 год (кукурудзяна солома-6, дріжджовий екстракт-15)	0,41	Відносно висока антиоксидантна активність проти супероксидних аніон- радикалів: у концентрації 10 мг/мл	Wang, Salem, & Sani, 2020

1.3. Синтез поверхнево-активних речовин та біосурфактантів

Бактерії роду *Geobacillus* маю багатий потенціал у синтезі біосурфактантів (вторинних метаболітів, синтезованих мікроорганізмами, які за своєю природою є амфифільними молекулами і служать альтернативою синтетичним сурфактантам, що виробляються хімічною промисловістю). Біологічні сурфактанти (різновид ПАР) - це речовини, які знижують поверхневий і міжфазний натяг між рідинами або між рідиною і твердою поверхнею. Вони широко використовуються у видобутку нафти, харчовій, косметичній, медичній промисловостях та екологічній галузі.

Відомо, що ПАР, синтезовані *Geobacillus* мають високу термостабільність, біодеградабельність і екологічність, тому, їх слід розглядати як перспективні аналогові матеріали для заміни синтетичних. Термофіли підходять для промислового виробництва завдяки коротким термінам їх виготовлення, високої стійкості до забруднень і стабільний синтез продукту при високих температурах (Таблиця 1.3). Крім того, біофакти *Geobacillus* проявляють антимікробну, антиоксидантну та емульгуючу активність, що підвищує їх корисність у медицині та біотехнології (Li та ін., 2023; Al-Jailawi, Nasir, & Aziz, 2015; Manchola, & Dussán, 2014).

У дослідженні Albasri та ін. (2024) вивчалось єднання термостабільного рамноліпідного біосурфактанту бактерією *Geobacillus stearothermophilus*. Ці сполуки виявили сильну антибактеріальну активність проти певних людських та рослинних патогенних бактеріальних і грибкових ізолятів. Наприклад, ріст пшениці покращився завдяки додаванню цієї сполуки в концентрації 5%. Тому модифікована речовина може бути використана як перспективний емульгатор, стимулятор росту рослин і агент утилізації відходів.

Czinkóczy i Németh (2023) також моделювали етап ферментації для виробництва сурфактантів *Geobacillus stearothermophilus* DSM2313. Параметри застосування ферментації показали, що вихід ПАР в умовах ферментації значно покращився, що важливо для промислових процесів.

Сурфактант, екстрагований з *Geobacillus thermoleovorans* JQ 912239, показав хороші властивості термостабільності. Його дослідження проводилися Majid

Hussein, Nasir, & Aziz (2015). Цей біосурфактант має високу молекулярну вагу (ймовірно, нового покоління), тому його потрібно додатково вивчати для остаточної характеристики, щоб визначити особливості застосування.

У дослідженні Li та ін. (2023) вивчалася структурна різноманітність ліпопептидних сурфактантів, вироблених *Geobacillus thermodenitrificans* ME63. Їх унікальна структура відкриває ряд можливостей для біомедичних технологій, зокрема для створення екологічно чистих емульгаторів, та у нафтовій промисловості.

Таблиця 1.3

Характеристика поверхнево-активних речовин та біосурфактантів синтезованих бактеріями роду *Geobacillus*

Штам	Умови культивування (джерело вуглецю та азоту, г/л)	Склад ПАР	Концентрація, г/л	Зниження поверхневого натягу, мН/м	Індекс емульгування E ₂₄ , %	Сфери практичного застосування	Джерело
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	50°C, 120 об/хв, рН 7 ± 0,2, 7 днів (відпрацьована соняшникова олія-10, (NH ₄) ₂ SO ₄ -1)	Рамноліпіди	0,41	25,6 ± 0,1	52	Сільськогосподарське господарство	Albasri та ін., 2024
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM2313	37°C, 150 об/хв, рН 7 ± 0,2, 48 год (глюкоза-50, NH ₄ NO ₃ -2, Na-EDTA-2.2×10 ⁻³)	-	3,88	70.5 ± 0.5	53.8 ± 1.84	Підвищення нафтовидобутку, біоемульгатор	Czinkóczy, & Németh, 2023
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ME63	37°C, 180 об/хв, рН 7,2 ± 0,2, 72 год (пептон-10, дріжджовий екстракт-5)	Ліпопептиди	0,81	25,2	54,5	Нафтова промисловість	Li та ін., 2023
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> JQ 912239	55°C, 180 об/хв, рН 7 ± 0,2, 7 днів (глюкоза-5, NH ₄ NO ₃ -1, сира нафта-1)	Тригліцериди	-	53	68	-	¹ Majid Hussein, Nasir, & Aziz, 2015

РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ НАПРЯМИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *GEOBACILLUS*

2.1. Біосинтез наночастинок

З кожним роком інтерес до біотехнології з наночастинками зростає, а біотехнологія стала галуззю, яка дозволяє контрольоване створення, оптимізацію, модифікацію та трансформацію структур і речовин менших за 100 нм, досягаючи нових властивостей, критеріїв, характеристик, а також цілей (Silva, 2016). Наразі, біосинтез наночастинок є одним із перспективних напрямків сучасної біотехнології: має високу продуктивність, ефективність та широкий спектр застосувань синтезованого продукту, екологічність та економічність на ринку. Наночастинки на біологічній основі мають високу біосумісність, стабільність, багатофункціональність і багатогранність (Calderón-Jiménez, та ін., 2017; Rathod, Preetam, Pandey, & Vera, 2024). Термостійкі бактерії роду *Geobacillus* здатні генерувати металеві наночастинки (Таблиця 2.1) і відіграють важливу роль в даних процесах. Метаболічні ферменти та біомолекули сприяють відновленню та стабілізації срібних (AgNPs), золотих (AuNPs) та селенових (SeNPs) наночастинок цими мікроорганізмами. Розроблені наночастинки з групи бактерій *Geobacillus* виявляють антибактеріальну, антиоксидантну, каталітичну та апоптотичну активність проти ракових клітин і можуть використовуватися в медичній, екологічній та загальній практиці (Tiquia-Arashiro, Rodrigues, Tiquia-Arashiro, & Rodrigues, 2016; Kumar, Prasad, Manjhi, & Prasad, 2020; Girilal, Fayaz, Balaji, & Kalaichelvan, 2013; Fayaz, Girilal, Rahman, Venkatesan, & Kalaichelvan, 2011; Correa-Llantén, Muñoz-Ibacache, Castro, Muñoz, & Blamey, 2013; Youssif, Soliman, Sabry, & Ghozlan, 2020; Čekuolytė, Šapaitė, Žemgulytė, Gudiukaitė, & Lastauskienė, 2024; Sekuolyte, та ін., 2023).

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Васильєва О.Л.			РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ НАПРЯМИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>GEOBACILLUS</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.Л.					26	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Čekuolytė та ін. (2023) розтлумачили синтез наночастинок срібла (AgNPs) *Geobacillus sp.* 25, які виявляють високу антибактеріальну активність та стабільність. У подальшій роботі Čekuolytė, Šapaitė, Žemgulytė, Gudiukaitė, & Lastauskienė (2024) було вивчено властивості наночастинок, вироблених *Geobacillus sp.* 612 та *Geobacillus sp.* 95, в процесі індукції апоптозу в ракових клітинах. Результати показали, що ці наночастинки мають значний протипухлинний потенціал без впливу на здорові клітини (рис. 2.1).

Ghasemi та ін. (2018) оцінили синтез AgNPs за допомогою спор *Geobacillus stearothermophilus* IBRC-M 10771 та *Bacillus subtilis* IBRC-M 10997. З цього дослідження зроблено висновок, що AgNPs, синтезовані з використанням *Geobacillus*, мають менші розміри, підвищену однорідність розподілу розмірів та термічну стабільність. Завдяки цим властивостям ці наночастинки є привабливими для застосування при високих температурах, наприклад, в фармацевтиці. Youssif, Soliman, Sabry, & Ghazlan (2020) проаналізували синтез AgNPs бактеріями *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 з геотермальних джерел. Наночастинки не лише виявляли антимікробну активність, але й пригнічували розвиток біоплівки патогенів. Вчені також довели, що такі AgNPs працюють як катализатори для розкладання органічних барвників, надаючи їм екологічні застосування.

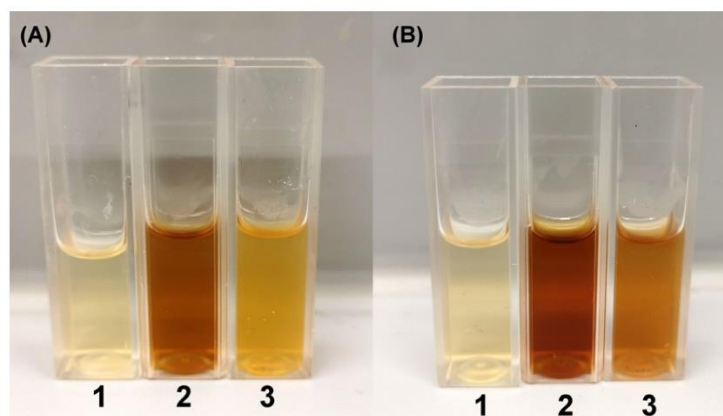


Рис 2.1 Оцінка утворення AgNPs за допомогою *Geobacillus* spp. через 24 год (А) та 48 год (Б):
1 – середовище росту бактерій + 2 мМ AgNO₃; 2 – супернатант *Geobacillus sp.* 95 + 2 мМ AgNO₃;
3 – супернатант *Geobacillus sp.* 612 + 2 мМ AgNO₃ (Čekuolytė, Šapaitė, Žemgulytė, Gudiukaitė, & Lastauskienė, 2024)

Correa-Llantén, Muñoz-Ibacache, Castro, Muñoz, & Blamey (2013) визначили і описали біосинтез наночастинок золота (AuNPs) термофільною бактерією *Geobacillus sp.* ID17. AuNPs показали високу каталітичну активність, і їх потенціал для застосування було виявлено в хімічному синтезі та очищенні стічних вод. Науковці зазначили, що ці наночастинок отримали нову морфологію завдяки ферментам, що виділяються термофільною бактерією.

Geobacillus stearothermophilus може синтезувати кожен з двох видів AgNPs і AuNPs, - так описано в дослідженнях Fayaz, Girilal, Rahman, Venkatesan, & Kalaichelvan (2011), де і виявлено спектр біологічної активності двох типів наночастинок. Крім того, висока провідність і стабільність наночастинок вказують на їх потенційні застосування в електроніці та енергетиці. Girilal, Fayaz, Balaji, & Kalaichelvan (2013) використовували AuNPs, синтезовані *Geobacillus stearothermophilus*, у своїх дослідженнях з молекулярній біології. Ними було обґрунтовано, що золоті наночастинок додані у реакцію полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) додають їй ефективності та специфічності, що є корисним в генетиці та діагностиці.

У дослідженні, проведеному Kumar, Prasad, Manjhi, & Prasad (2020), йдеться про біосинтез наночастинок селену (SeNPs) за допомогою безклітинного водного екстракту *Geobacillus sp.* ARB04. Отримані наночастинок мали значно вищий вміст антиоксидантів, чим викликали цікавість для використання в медицині, косметології та як харчові добавки. Також, науковці описали їх низьку цитотоксичність, що сприяє безпеці в біомедичних умовах.

Таблиця 2.1

Бактерії роду *Geobacillus* для біосинтезу наночастинок

Штам	Умови культивування	Параметри біосинтезу наночастинок	Характеристика наночастинок, властивості	Джерело
<i>Наночастинки срібла</i>				
<i>Geobacillus</i> sp. 25	Триптон, м'ясний екстракт, 55°C, 48 год, 180 об/хв	Супернатант, 2 мМ AgNO ₃ , 55°C, 200 об/хв, 48 год	Сферичні, 10-78 нм Значення дзета-потенціалу (мВ) AgNPs -25,7 ± 0,8. Антимікробна властивість	Cekuolyte та ін., 2023
<i>G. stearothermophilus</i> IBRC-M 10771	Пептон, екстракт яловичини, 37°C, 24 год Інокуляція: пептон, м'ясний екстракт, рН 7 ± 0,2, 37°C, 24 год	Споровий екстракт, 1 мМ AgNO ₃ , кімнатна температура, 24 год	Сферичні, 15-50 нм Антимікробна активність щодо <i>S. mutans</i> (6 мкг/мл), проти <i>S. sobrinus</i> (6 мкг/мл), проти <i>C. glabrata</i> (50 мкг/мл), проти <i>C. albicans</i> (25 мкг/мл)	Ghasemi та ін., 2018
<i>G. thermodenitrificans</i> AZ1	Триптон, дріжджовий екстракт, 55°C, 48 год, 200 об/хв	Супернатант, 1 мМ AgNO ₃ , 55°C, 200 об/хв, 48 год, без доступу світла	Сферичні, 1.44-16.3 нм Антимікробна активність, зона затримки росту <i>E. coli</i> ATCC 10231 (19 мм), <i>K. pneumonia</i> ATCC 13883 (16 мм), <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (25 мм), <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (23 мм), <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (40 мм)	Youssif, Soliman, Sabry, & Ghozlan, 2020
<i>Geobacillus</i> sp. 612	Глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт, 30°C, 130 об/хв	Супернатант, 2 мМ AgNO ₃ , 55°C, 200 об/хв, 48 год	Сферичні, 10-50 нм Значення дзета-потенціалу (мВ) AgNPs -28.37 ± 0.14 Антимікробна активність щодо <i>C. guilliermondii</i> (5 мкг/мл), проти <i>S. cerevisiae</i> (25 мкг/мл)	Čekuolytė, Šapaitė, Žemgulytė, Gudiukaitė, & Lastauskienė, 2024

Наночастинки золота				
<i>G. stearothermophilus</i>	Казеїн, соєвий шрот, декстроза, рН 7 ± 0,2, 60°C, 48 год	Біомаса, деіонізована вода, 27°C, 200 об/хв, 48 год Безклітинний водний екстракт, 10 ⁻³ М Н[АuСl ₄], 24 год, без доступу світла	Сферичні, 5-14 нм	Fayaz, Girilal, Rahman, Venkatesan, & Kalaichelvan, 2011
<i>G. stearothermophilus</i>	Казеїн, соєвий шрот, декстроза, рН 7 ± 0,2, 60°C, 48 год	Біомаса, деіонізована вода, 200 об/хв, 48 год Безклітинний водний екстракт, 10 ⁻³ М Н[АuСl ₄], без доступу світла	Сферичні, монодисперсні, 6-11 нм	Girilal, Fayaz, Balaji, & Kalaichelvan, 2013
<i>Geobacillus sp.</i> ID17	Дріжджовий екстракт, триптон, рН 7 ± 0,2, 65°C, 16 год	Біомаса, деіонізована вода, 6000 об/хв, 5 хв Безклітинний супернатант, 1 мМ Н[АuСl ₄], 65°C, 30 хв	Квазіправильні багатогранники, 10-20 нм	Correa-Llantén, Muñoz-Ibacache, Castro, Muñoz, & Blamey, 2013
Наночастинки селену				
<i>Geobacillus sp.</i> ARB04	-	Безклітинний водний екстракт, 10 мМ Na ₂ SeO ₃ , без доступу світла	Сферичні, 30-60 нм Протимікробна, антиоксидантна, цитотоксична активність	Kumar, Prasad, Manjhi, & Prasad, 2020

2.2. Біосинтез бактеріоцинів та бактеріоциноподібних сполук

Бактеріоцини та бактеріоциноподібні сполуки — це білки або пептиди, які продукуються бактеріями для інгібування росту інших мікроорганізмів, які зазвичай тісно пов'язані з продукуючим штамом (Perez, Zendo, & Sonomoto, 2014; Alvarez-Sieiro, Montalbán-López, Mu, & Kuipers, 2016). Вони є надзвичайно різноманітною та гетерогенною групою сполук з характерними властивостями і актуальні через зростаючу стійкість патогенів до стандартних антибіотиків. Бактеріоцини, на відміну від звичайних антибіотиків, мають вузький спектр дії, що знижує ризик розвитку стійкості (резистентності) (Cotter, Ross, & Hill, 2013; Heilbronner, Krismer, Brötz-Oesterhelt, & Peschel, 2021).

Наразі ми маємо значне розуміння бактеріоцинів, проте, багато з них все ще не описані за їх точним механізмом дії. Для деяких бактеріоцинів цільова молекула (рецептор) поки невідомі. Є такі, де рецептори були ідентифіковані, проте, точна взаємодія між бактеріоцином і рецептором залишається неясною або неповною. Існує безліч бактеріальних видів та їх штамів, які можуть продукувати бактеріоцини, які ніколи раніше не вивчалися. Більше того, досліджень про бактеріоцини, що генеруються термофільними бактеріями мало, і їх амінокислотні послідовності не визначені (Acedo та ін., 2018; Özdemir & Biyik, 2012; Alkhalili та ін., 2016).

Завдяки своїй термофільності, бактерії роду *Geobacillus*, можуть бути потенційними продуцентами бактеріоцинів, стабільних при високих температурах та в несприятливих умовах (Таблиця 2.2). Бактеріоцини, синтезовані *Geobacillus*, наприклад геобациліни, мають високу молекулярну масу, термостабільність, активні проти різноманітних патогенів і, отже, мають потенціал для масштабного виробництва. Застосування їм було знайдено в різних галузях: медицина (боротьба з інфекційними захворюваннями), харчова промисловість (біоконсерванти) та сільське господарство (контроль фітопатогенів) (Başbülbül Özdemir, & Biyik, 2012; Prankutè та ін., 2015; Choi, & Kong, 2023; Tawangalun та ін., 2024).

Başbülbül Özdemir, & Biyik (2012) вивчали бактеріоциноподібну речовину, синтезовану *Geobacillus toebii* НВВ-247. Отримана сполука мала високу термостабільність і антибактеріальну активність проти грампозитивних патогенів,

що окреслює потенціал її використання в якості біоконсерванту в харчовій промисловості. Також був описаний термостабільний ендолізін LysGR1, синтезований з бактеріофага, що інфікує *Geobacillus stearotherophilus* ATCC 10149. LysGR1 був ефективним у знищенні бактерій, що робить його перспективним в терапії інфекцій, які викликані стійкими мікроорганізмами (Choi, & Kong, 2023).

Geobacillus thermodenitrificans NG80-2 синтезує лантибіотики — клас бактеріоцинів, що містять модифіковані пептидні структури (Garg, Tang, Goto, Nair, & Van Der Donk, 2012). Kaunietis (2018) в своїх наукових дослідженнях описав нові бактеріоцини, утворені термофільними бактеріями, такими як *G. stearotherophilus* 15 та підкреслив їхню стійкість до термічної денатурації і широкий спектр активності. Інший антибактеріальний матеріал був створений з бактерії *Geobacillus kaustophilus* Tm6T2 (a). Він виявив ефективність проти *Salmonella typhimurium* і можливість свого використання в розробці антибактеріальних агентів проти шлунково-кишкових патогенів (Tawangalun та ін, 2024).

Vaičiškaitė та ін. (2019) описали геобацилін 26 - новий, високомолекулярний бактеріоцин III класу, утворений термофільною бактерією *Geobacillus sp.* 15. Він виявив вузький антибактеріальний спектр проти інших термофільних бактерій. Цей бактеріоцин відрізняється від більшості інших високомолекулярних бактеріоцинів тим, що не є ферментом гідролізу клітинної стінки.

Таблиця 2.2

Особливості біотехнології бактеріоцинів та бактеріоциноподібних сполук за допомогою бактерій роду *Geobacillus*

Штам	Умови культивування	Тип бактеріоцину	Властивості та біологічна дія	Джерело
<i>Geobacillus</i> sp. 15	Казеїновий пептон-10, дріжджовий екстракт-5, 37°C, 24 год	Геобацилін 26 (Geo26) (Бактеріоцин класу III)	Велика і чітка зона гальмування- <i>G. jurassicus</i> , <i>G. kaustophilus</i> , <i>G. Parageobacillus</i> 1. Помірна зона гальмування- <i>G. Stearothermophilus</i> , <i>P. toebii</i> . Мінімальна інгібуюча концентрація для <i>P. Genomospcies</i> 1 NUB36187-637,5 нг/мл	Vaičikauskaitė та ін., 2019
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 10149	Казеїновий пептон-17, декстроза-2,5, соєвий пептон-3, 50°C, 24 год	Ендолизин GR1	Значна антибіоплівкова активність проти <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980	Choi & Kong, 2023
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	Казеїновий пептон-10, дріжджовий екстракт-5, 55 °C, 48 год	Геобацилін I Лантибіотичний бактеріоцин класу I	Висока активність проти <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ATCC 27957, <i>Bacillus anthracis</i> Sterne 7702. В сім разів нища активність проти <i>Lactococcus lactis</i> , ніж у нізину	Garg, Tang, Goto, Nair, & Van Der Donk, 2012
<i>G. stearothermophilus</i> 15	Пептон-10, яловичий екстракт-1, дріжджовий екстракт-2, 50°C	Геобацилін 18 (Geo18)	Висока активність проти <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Kaunietis, 2018
<i>Geobacillus toebii</i> HBB-247	Настій яловичого серця-5, пептон-10, настій телячого мозку-12,5, глюкоза-2, 65°C, 24 год	Бактеріоциноподібна інгібіторна речовина (BLIS)	Зона гальмування: <i>G. stearothermophilus</i> DSMZ 22 та <i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525-20 мм, <i>Listeria</i> sp. та <i>E. faecalis</i> ATCC 51299-9 мм, <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB-13-14 мм, <i>Geobacillus</i> sp. HBB-269-12 мм, <i>Geobacillus</i> sp. HBB-270-14 мм, <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB-229-13 мм	Başbülbül Özdemir & Biyik, 2012
<i>G.kaustophilus</i> Tm6T2 (a)	Яловичий настій-2, крохмаль-1,5, гідролізат казеїну-17,5, 55°C, 36 год, 150 об/хв, pH 8	Лантибіотичний бактеріоцин	Зона гальмування для <i>Salmonella typhimurium</i> -13,11 мм	Tawangalun та ін., 2024

2.3. Біотехнології рекомбінантних сполук

У сучасній біотехнології біосинтез рекомбінантних сполук займає унікальне місце завдяки значному потенціалу в медицині, харчовій промисловості, екології та інших галузях. Рекомбінантні сполуки, які утворюються шляхом перенесення генів з одного організму в інший (рис 2.2), здатні отримувати функціональні агенти з унікальними характеристиками (наприклад, термостабільність, стійкість до агресивного середовища або висока каталітична активність).

Існує кілька етапів створення рекомбінантних сполук:

1. Ізоляція гена з донорських бактерій (у нашому випадку бактерій роду *Geobacillus*).
2. Клонування гена у вектор (зазвичай у склад плазмід).
3. Гетерологічна експресія в модельних організмах (*E. coli*, *Escherichia coli* BL21, *Escherichia coli* C41 (DE3), *Escherichia coli* Rosetta™ 2(DE3), *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* WB800 тощо) для отримання цільової сполуки.
4. Очищення та характеристика сполуки, включаючи її властивості, ідеальні умови для активності, стабільність тощо.

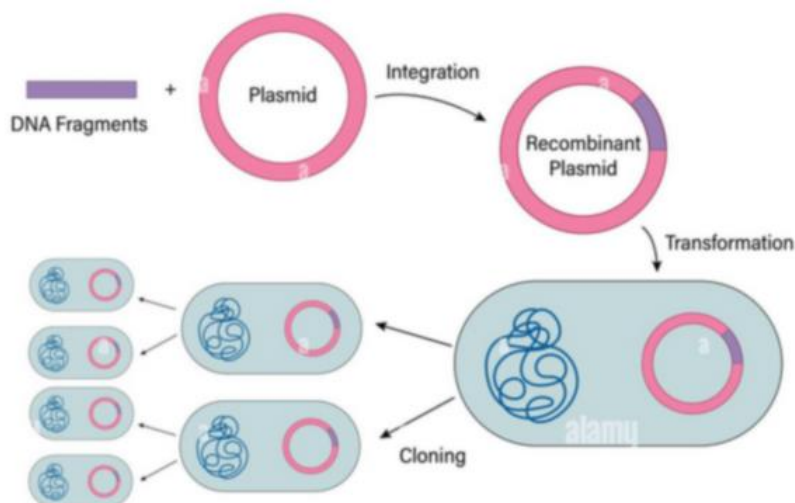


Рис 2.2 Ілюстрація конструювання та впровадження рекомбінантної ДНК у модельний мікроорганізм (Chen та ін., 2022; Doukyu, Ito, & Sugimoto, 2024)

Бактерії роду *Geobacillus* є джерелом генів, які кодують термостабільні сполуки, здатні функціонувати при високих температурах і в несприятливих умовах (Таблиця 2.3).

Для забезпечення стабільної роботи в складних умовах такі сполуки активно використовуються в промислових біопроесах (Chen та ін., 2022; Doukyu, Ito, & Sugimoto, 2024). Наприклад, ген α -амілази в *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465 був успішно експресований в *Escherichia coli*, що було адаптовано до температурно-оптимального ферменту при 70°C. Застосування цього ферменту може бути в текстильній промисловості (розшарування текстилю), у виробництві миючих засобів, паперовій та хлібопекарській промисловості (Al-Amri et al., 2021).

Рекомбінантні α -амілази, синтезовані за допомогою генів бактерій *Geobacillus*, широко використовуються у фармацевтичній, харчовій, текстильній, косметичній промисловостях, у виробництві миючих засобів, біопалива, паперу, кормів для тварин та як біокаталізатори (Arya, Chauhan, Verma, & Sharma, 2024; Burhanoğlu, Sürmeli, & Şanlı-Mohamed, 2020; Al-Amri та ін., 2021; Kurniawan, Rohman, & Witasari, 2024).

Рекомбінантні ліпази, що кодуєть введений ген бактерій *Geobacillus*, знайшли використання в хімічній, харчовій, фармацевтичній, косметологічній, миючій, біодизельній та біокаталізаторній галузі (Druteika та ін., 2020; Elemosho, Suwanto, & Thenawidjaja, 2021; Ishak та ін., 2020; Jo, Kim, Lee, Moon & Cha, 2021; Salas-Bruggink, Guzmán, Espina, & Blamey, 2024; Tang та ін., 2019; Wang, Dasetty, Sarupria, & Blenner, 2021). Ліпази використовуються у виробництві біопалива або в біосинтезі фармацевтичних препаратів разом з розчинниками (етанол, ізопропанол, диметилсульфоксид (DMSO), ацетонітрил, ацетон і гексан), що призводить до інактивації ферментів протягом швидких циклів процесу (Salas-Bruggink, Guzmán, Espina, & Blamey, 2024). Також, завдяки їх стійкості до хімічних денатурантів, пральних і миючих засобів, органічних розчинників та інгібіторів білка, - термостабільні ліпази в основному діють як потужний промисловий біокаталізатор (Ishak та ін., 2020). *Escherichia coli* BL21 є найбільш часто використовуваним модельним організмом для експресії.

Як модельний організм для експресії рекомбінантної ліпази (T1.2RQ) у дослідженні Elemosho, Suwanto, & Thenawidjaja (2021) був використаний *Bacillus subtilis* WB800. Вибір був обумовлений здатністю до позаклітинного синтезу

Bacillus subtilis WB800, оскільки це значно зменшує час для подальшого очищення та спрощує зусилля необхідні в процесі руйнування клітин. Цей ізольований білок є вільним від ендотоксинів, чим безпечний для харчових і медичних застосувань.

Чисельні важливі промислові застосування, завдяки своїй широкій специфічності, мають лаккази: відбілювання текстилю, деградація лігніну для виробництва паперу, детоксикація забруднювачів, освітлення вина, органічний хімічний синтез, біосенсинг (Jeon & Park, 2020). Лакказа з геном *Geobacillus sp.* ID17 має великий біотехнологічний потенціал завдяки своїй термоактивності, термостабільності, а також стійкості до звичайних інгібіторів. Крім того, вона може частково біодеколювати структурно різні барвники, і при масштабуванні може бути використана для дезактивації промислових стічних вод (Cortés-Antiquera та ін., 2023).

Термостабільні амінотрансферази можуть сприяти синтезу амінокислот, наприклад, таких як аспарагінова кислота (один з основних компонентів аспартаму - синтетичного підсолоджувача, що використовується як харчова добавка) (Gharib, Chohan, Rashid, & Akhtar, 2020).

Синтез рекомбінантної флавінредуктази *Geobacillus mahadii* Geo-05 у змішаному середовищі з різними флавінзалежними монооксигеназами призводить до утворення проміжних сполук, які важливі в різних реакціях. Наприклад, флавінредуктаза може відновлювати азобарвники, нітроароматики та фенольні сполуки, що застосовуються в текстильній, паперовій, шкіряній та нафтовій промисловості. Ці шкідливі речовини потрапляють в навколишнє середовище і є агресивними забруднювачами ґрунтових і водних систем. Ці сполуки далі деградуються в менш токсичні форми за допомогою флавінредуктази (Husain, Jamaluddin & Jonet, 2024).

Термостабільні рекомбінантні L-аспарагінази, крім використання в медицині, також використовуються як активні агенти харчової промисловості. Як зазначено в дослідженні Özdemir, Orhan, Atasavum & Tülek (2022), це не тільки зменшує утворення акриламід, а й мінімізує канцерогенну та нейротоксичну сполуку акриламід, що робить їжу безпечнішою для споживачів.

Протеази синтезовані за допомогою *Geobacillus sp.* є надзвичайно термостікими стабільними розчинами і можуть сприяти біодеградації осаду стічних вод, в першу чергу в миючій, шкіряній та медичній галузях (Lai та ін., 2023; Tülek, Özdemir, & Ramadhan, 2020).

Характеристика ферментів синтезованих рекомбінантними бактеріями роду *Geobacillus*

Штам	Введений ген, джерело виділення	Умови культивування (джерело вуглецю та азоту, г/л)	Фермент	Активність в культуральній рідині, Од/мл	Джерело
<i>Escherichia coli</i> BL21	Ген целюлази з <i>Geobacillus</i> sp. TP-3	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 37 °С, 12 год, 150 об/хв	rCel_TP Целюлаза	-	Arya, Chauhan, Verma, & Sharma, 2024
<i>Escherichia coli</i> BL21	Ген α -амілази з <i>Geobacillus</i> sp. GS33	Триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 55 °С, 200 об/хв	α -амілаза	95-107 (в культуральній рідині)	Burhanoğlu, Sürmeli, & Şanlı-Mohamed, 2020
<i>Escherichia coli</i> BL21	Ген α -амілази з <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM-465	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 37 °С, 200 об/хв	α -амілаза	153.6 (в культуральній рідині)	Al-Amri та ін., 2021
<i>Escherichia coli</i> BL21	Ген α -амілази з <i>Geobacillus</i> sp. DS3	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 37 °С, 24 год, 100 об/хв	α -амілаза	-	Kurniawan, Rohman, & Witasari, 2024
<i>Escherichia coli</i> BL21	Гени ліпаз GD-28, GD-95 та GD-66 <i>Geobacillus</i> sp. strain 28	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну, 37 °С, 150-180 об/хв	GDlip43 Ліпаза	40 (очищений фермент)	Druteika та ін., 2020

Продовження табл. 2.3

<i>Bacillus subtilis</i> WB800	Ген ліпази T1.2RQ <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 37 °С, 24 год	T1.2RQ Ліпаза	5.7 (очищений фермент)	Elemosho, Suwanto, & Thenawidjaja, 2021
<i>Escherichia coli</i> BL21	Ген ліпази <i>Geobacillus zalihae</i>	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну та 35 мкг/мл хлорамфеніколу, 37 °С, 24 год, 180 об/хв	Ліпаза T1	-	Ishak та ін., 2020
<i>Escherichia coli</i> BL21	Гени ліпаз <i>lip29</i> і <i>est29</i> <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> KCTC3921	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням ампіциліну, 37 °С	Est29 і Lip29 ліпаза типу GDSL	2.27 (очищений фермент)	Jo, Kim, Lee, Moon, & Cha, 2021
<i>Escherichia coli</i> C41 (DE3)	Ген ліпази <i>lip7</i> з <i>Geobacillus</i> sp. ID17	Ферментний гідролізат казеїну – 20, суміш жовчних солей – 1,5 з додаванням канаміцину, 30 °С, 30 год, 180 об/хв	Lip7 ліпаза	-	Salas-Bruggink, Guzmán, Espina, & Blamey, 2024
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген ліпази <i>Geobacillus</i> sp. 12AMOR1	Триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 37 °С, до отримання оптичної щільності 0,6-0,8	GMGL ліпаза	-	Tang та ін., 2019

<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген ліпази <i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 50 мг/мл ампіциліну та 5 мг/мл тетрацикліну, 24 год, 225 об/хв	E316G та E361G ліпаза	-	Wang, Dasetty, Sarupria, & Blenner, 2021
<i>Escherichia coli</i> BL21	Ген лаккази <i>mco07690</i> з <i>Geobacillus</i> sp. ID17	Триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, глюкоза – 0.5, α -лактоза – 2, з додаванням 2 мМ CuSO ₄ та 30 мкг/мл канаміцину, 23 °C, 30 год, 180 об/хв	ID17 лаккази	-	Cortés-Antiguera та ін., 2023
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген лаккази NZ_CP014749 з <i>Geobacillus</i> sp. JS12	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ⁻¹ ампіциліну та 1 мМ CuSO ₄ , 37 °C	LacG лаккази	-	Jeon & Park, 2020
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген естерази estGSU753 з <i>Geobacillus subterraneus</i> DSM13552	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням антибіотику, 20 °C, 24 год	EstGSU753 естераза	70 (в культуральній рідині)	Cai, Lin, Shen, Wei, & Wei, 2020
<i>Escherichia coli</i> BL21 CodonPlus (DE3)-RIL	Ген аспаратамінотрансферази <i>G. thermopakistanensis</i> MAS1	-	AST _{Gt} Аспаратамінотрансфераза	104 (очищений фермент)	Gharib, Chohan, Rashid, & Akhtar, 2020

Закінчення табл. 2.3

<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Ген флавінредуктази <i>Geobacillus mahadii</i> Geo-05	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну, 37 °С, 200 об/хв	GMHpaC флавінредуктаза	-	Husain, Jamaluddin, & Jonet, 2024
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ 2(DE3)	Ген L-аспарагінази <i>Geobacillus</i> <i>kaustophilus</i>	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну, 37 °С, поки оптична щільність не досягла 0,6 при 600 нм	GkASNase L- аспарагіназа	358 (очищений фермент)	Özdemir та ін., 2023
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ 2(DE3)	Ген L-аспарагінази <i>Geobacillus</i> <i>kaustophilus</i> DSM 7263T	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну, 37 °С	GkASN L-аспарагіназа	119.5 (очищений фермент)	Özdemir, Orhan, Atasavum & Tülek, 2022
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген піридоксалькінази GhpdxK з <i>Geobacillus</i> sp. H6a	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 50 мкг/мл ⁻¹ канаміцину, доки поглинання при 600 нм культури не збільшилося до 0,5.	GhPLK Піридоксалькіназа	-	Pasri, Champasri, & Trongpanich, 2022
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген протеази <i>GS-SP1</i> з <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> H6	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, 37 °С, 24 год, 220 об/хв	Протеаза	-	Lai та ін., 2023
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ген протеази <i>Geobacillus</i> <i>kaustophilus</i> DSM 7263T	Казеїновий пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, з додаванням 100 мкг/мл ампіциліну, 37 °С	Протеаза	5.6 (очищений фермент)	Tülek, Özdemir, & Ramadhan, 2020

2.4. Висновки

Термофільні бактерії роду *Geobacillus* є перспективними мікроорганізмами для сучасної біотехнології завдяки їх здатності адаптуватися до екстремальних умов і здатності синтезувати широкий спектр біологічно активних сполук. Використання синтезованих сполук включає ферментативні процеси, створення екологічно чистих матеріалів, використання в медичних цілях та розробку інноваційних підходів до нанотехнологій. Наукові дослідження підтверджують важливість цих бактерій у вдосконаленні біотехнологічних процесів та розробці нових біопродуктів.

Відтак, ензимний потенціал *Geobacillus* має відношення до виробництва термостабільних ферментів: ліпази, протеази, ксиланази, пулуланази та інших. Завдяки високій термостабільності та активності цих ферментів вони є важливими у виробництві біопалива, а також у харчовій промисловості та обробці відходів. Екзополісахариди, синтезовані *Geobacillus*, демонструють антиоксидантну, протиракову та імуностимулюючу активність. Вони мають широкий потенціал для використання в косметології, медицині та харчовій промисловості. Біосурфактанти та сурфактанти, синтезовані *Geobacillus*, демонструють високу стабільність при підвищених температурах. Вони є перспективними у нафтовій, харчовій та медичній промисловості. Біосинтез наночастинок завдяки бактеріям *Geobacillus* важливий для виробництва матеріалів з антимікробною активністю та іншими вагомими характеристиками. Бактерії роду *Geobacillus* утворюють бактеріоцини та бактеріоциноподібні сполуки, які мають потенційні антимікробні властивості, що уможливорює створення нових агентів, як життєздатної альтернативи антибіотикам. Експресія генів *Geobacillus* у модельних мікроорганізмах створює умови для синтезу високоефективних термостабільних ферментів та інших біопродуктів, а засобами генної інженерії можливості створювати штами з покращеними характеристиками.

Проте, необхідні подальші дослідження потенціалу бактерій роду *Geobacillus* для:

- підвищення метаболічної продуктивності штамів та вивчення нових біологічно активних властивостей синтезованих полісахаридів;

- доведення економічної ефективності ПАР синтезованих *Geobacillus*;
- сприяння впровадженню кінцевих продуктів у вигляді наночастинок у масове виробництво, затвердження аналітичної нормативної документації та технічних регламентів і офіційних протоколів;
- поглиблення вивчення механізмів дії бактеріоцинів та їх ефективності проти резистентних штамів бактерій;
- збільшення виходу термостабільних ферментів та їх сталість за різних умов промислових процесів.

Комплексність підходу включає оптимізацію умов культивування, підвищення економічної ефективності усіх процесів, стандартизацію біосинтезу та можливість масштабування.

Основні тенденції та майбутні напрями наукових досліджень мають бути спрямовані на підвищення продуктивності бактерій *Geobacillus* у біосинтезі цільових сполук, вивчення їх активності, запровадження екологічно чистих біотехнологічних методів, а також пошук нових штамів, генетичну модифікацію існуючих штамів та оцінку властивостей продуктів, синтезованих у різних галузях.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Характеристика та використання рекомбінантних ліпаз як інноваційного біокаталізатора

Триацилгліцеролліпази (Е.С. 3.1.1.3) або ліпази є сериновими гідролазами і входять до сімейства ліполітичних ферментів, що каталізують реакції розчеплення тригліцеридів на дигліцериди, а надалі на моногліцериди та вільні жирні кислоти (Ali, Khan, Hamayun, & Lee, 2023; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)).

Ліпази мають здатність працювати з субстратами погано розчинними у воді та проявляють свою каталізаційну активність у вигляді міжфазної активації, а саме підвищення активності на межі поділу ліпід-вода. Це дозволяє їх обширне використання у багатьох видах промисловості. Наприклад для каталізації реакції гідролізу в харчовій, біодизельній промисловості, а також для біоремедіації жирових відходів із промислових стоків. При очищенні стічних вод фермент каталізує розщеплення тригліцеридів на гліцерин і вільні жирні кислоти, тим самим руйнуючи складні ліпідні нашарування (плівки), в подальшому полегшуючи очищення середовища, відновлення якості водних ресурсів і запобігання утворення жирових пробок у каналізаційних системах. Зважаючи на коливання теплового режиму протягом доби, зміни значення рН через атмосферні опади, зміну солоності та можливість наявності агресивних сполук (як органічні розчинники: метанол, етанол, ацетон, хлороформ, що використовуються у фармацевтичній та хімічній промисловості і руйнують третинну структуру білків-ферментів, або феноли, поверхнево-активні речовини, сильні кислоти та луки, високі концентрації солей) у середовищі, що піддається очищенню, отримані за допомогою генної інженерії ліпази, можуть демонструвати більшу стабільність за таких умов, не втрачаючи активність та є більш оптимальним вибором для біоремедіації жирових забруднень

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Васильєва О.Л.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.					44	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

у природних умовах (Panyachanakul та ін., 2024; Nimkande & Bafana, 2022; Lee та ін., 2015).

Рекомбінантні ліпази, такі як наприклад Pflip1a, демонструють виняткову термостабільність, зберігаючи до 97% активності в діапазоні температур 70-90 °C (Liu, Li, & Yan, 2017). А ліпаза Lip7, отримана за допомогою рекомбінантної експресії генів *Geobacillus* sp. ID17 у *E. coli* C41 (DE3), є термолужним ферментом, що досягає максимальної активності (3350 ОД мг⁻¹) при 50 °C і рН 11, та зберігає активність до 60 °C при рН 8. Також залишаючись стабільним у присутності водорозчинних та гідрофобних органічних розчинників (метанол, етанол, ацетонітрил, ацетон, ізопропанол та ін.) та за певних умов інкубації проявляє ферментативну активацію. Висока сумісність з органічними розчинниками та термостабільність рекомбінантного ферменту робить його переконливим кандидатом для використання у різних галузях для біологічного каталізу реакцій (Salas-Bruggink, Guzmán, Espina, & Blamey, 2024).

У харчовій промисловості ліпази з такими унікальними властивостями використовуються для каталізу реакції внутрішньомолекулярної переестерифікації. Оскільки під час реакції, заміни гліцерину метиловим або етиловим спиртом, змінюється рН середовища, через утворення вільних жирних кислот, що призводить до часткової інактивації звичайних ферментів. Наприклад при модифікації молочного жиру, що дозволяє перерозподілити ацильні групи всередині молекул тригліцеридів з метою отримання пластичних жирів із конкретними температурами плавлення та потрібною за технологією пластичністю (Bora, Gohain & Das, 2013; Jaeger, Dijkstra & Reetz, 1999; Balcao, & Malcata, 1998). Також популярним місце застосування ферменту є процес синтезу ароматичних ефірів, що використовуються для збагачення запаху сирів та кондитерських виробів. Зокрема для каталізації реакції етерифікації каприлової кислоти з етанолом у середовищі на соєвій основі при 40+ °C і рН 8 з виходом етилкаприлату – сполуки, що надає вершково-молочний аромат витриманим сирам (Cong, та ін., 2019; McSweeney, 2004; Patel та ін., 2015).

У фармацевтичній галузі ферменти такого типу можуть забезпечувати синтез терпенових ефірів, що застосовуються як нейропротектори й протизапальні агенти. Наприклад, трансетерифікація гераніолу з оцтовою кислотою у n-гексані при 30+ °C, та можливість проведення реакції при діапазоні температур від 10 до 50 °C дає вихід 94% геранілацетату, що застосовується як допоміжний або активний інгредієнт у ліофілізованих препаратах і мазях (Bartling та ін., 2001; Liu, WeiZhuo, & Wei, 2022).

У біодизельній промисловості рекомбінатна ліпаза може значно спростити проведення двоетапної реакції гідроетерифікації. Тим самим каталізуючи гідроліз тригліцеридів до вільних жирних кислот і гліцерину у водній фазі при 30-40 °C та надалі зберігаючи активність приймати участь і у каталізі етерифікації цих кислот метанолом або етанолом у безрозчинниковому середовищі чи в гексані при 40-50 °C. Що дозволяє досягати понад 90% конверсії біодизелю за м'яких умов (без використання хімічних каталізаторів реакцій) та уникаючи надмірного утворення сольових побічних продуктів (Corrêa, та ін., 2011). А також завдяки своїм властивостям рекомбінантні ліпази здатні забезпечити конверсію тригліцеридів у біодизельні метилові та етилові ефіри з виходом більше 90% при температурах 60-70 °C і низькому вмісті води, уникаючи інактивації ферменту та утворення побічних продуктів. Таким чином завдяки поєднанню термостабільності та розчинникової толерантності ліпази забезпечують надійний та високоефективний каталіз реакцій для виробництва біодизелю (Bajaj, Lohan, Jha, & Mehrotra, 2010; Amini, та ін., 2017).

У косметичній промисловості ліпази можуть відігравати роль каталізаторів реакцій для синтезу дволанцюгових ефірів, необхідних у формуванні зволожувальних кремів та емоментів (косметичні речовини які мають пом'якшувальну дію, створюють захисну плівку та усувають стягнутість шкіри чи лущення). Так наприклад каталіз етерифікації олеїнової та бутанової кислот з бутанолом та олеїновим спиртом у середовищі ізооктану чи іонних рідин при 50-60 °C дає цінні ефіри, які значно покращують текстуру шкіри та надають зволожувальну активність продукту (Hümmer та ін., 2018; Zaidi, 2002).

Значною перспективою є застосування рекомбінантної ліпази для «зеленого» синтезу фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE). У реакції естерифікації між 2-фенілетанолом та кавовою кислотою в органічних середовищах (ізооктан, ацетон) при 60-70 °С. Фермент забезпечує конверсію речовин понад 90%, утворюючи потужний антиоксидантний, протизапальний, протираковий, антивірусний, антибактеріальний та протигрибковий агент, який може використовувати як самостійна речовина косметології та фармацевтиці, так і у процесі отримання хлорогенової кислоти для використання у косметичних засобах з антиоксидантними, омолоджуючими та фотопротекторними властивостями (Khan & Rathod, 2015; Chen, Chen, Chang, & Shieh, 2011; Tripon, Tulcan, Marc, Camen, & Paul, 2025; Jun, Jing, Shuangshuang, & Fuan, 2013).

Отримання та використання рекомбінантних ліпаз, що експресуються в гетерологічних системах, є надзвичайно перспективним напрямком сучасної біотехнології завдяки можливості їхньої інженерії задля підвищення стабільності та активності в шорокому діапазоні параметрів процесів. У цьому контексті даний проект зосереджений на розробці та отриманні рекомбінантної термостабільної ліпази для застосування у косметичній промисловості у якості каталізатора реакції естерифікації для синтезу фенетилового ефіру кавової кислоти (далі – CAPE).

3.2. Запальні захворювання шкіри в Україні: статистика та ринок спеціалізованих доглядових засобів

3.2.1 Оцінка рівня поширення запальних шкірних хвороб в Україні

За офіційними даними, дерматози в Україні є поширеними і показують тенденцію до збільшення. Так згідно даних Міністерства охорони здоров'я (далі – МОЗ) у 2005 р. загальна захворюваність на хвороби шкіри та підшкірної клітковини становила близько 4866,3 випадків на 100 тис. населення. Серед запальних дерматозів найбільш поширені контактний дерматит (749,4/100 тис. у 2005 р.) та atopічний дерматит (174,4/100 тис.), що свідчить про високий рівень алергологічної патології шкіри. За даними спеціалізованих оглядів, в Україні щороку зростає кількість пацієнтів із дерматитами, екземою, псоріазом, акне, тощо (Melnyk та ін.,

2022). Зокрема, за аналітичними дослідженнями, у період 2001-2011 рр. поширеність atopічного дерматиту серед дітей і підлітків зросла на 69,7%, а псоріазу на 46,5% (Волкославська, Гутнев, 2013).

Акне – одне з найпоширеніших дерматозів у підлітковому та молодому віці. За аналізом новітніх джерел можна дійти висновку, що акне лишається однією з найпоширеніших дерматологічних проблем суспільства (Zhu та ін., 2025; Alexis та ін., 2024; Hagenström та ін., 2024; Kim, & Kim, 2024; Какрoвbіa та ін., 2025). Згідно даних Державної наукової установи «Центру інноваційних технологій охорони здоров'я», близько 85% осіб віком 12-24 роки мають прояви акне. У дорослих (віком ≥ 25 років) акне зустрічається у $\approx 11\%$ населення, а після 44 років хвороба зберігається приблизно у 12% жінок та 3% чоловіків. Окрім того, за даними медичного спеціалізованого науково-практичного видання «Український журнал дерматології, венерології, косметології» за 2021 рік, статистично визначено, що акне становить 23-35% всіх звернень до дерматовенеролога. Важкі форми акне (конглобатні, пустульозні) трапляються майже у 20% хворих, а подальшим наслідком є косметичні рубці і порушення якості життя.

Атопічний і контактний дерматити – алергологічні дерматози, що частіше розвиваються у дітей. За останні роки відзначено зростання їх поширеності: за даними досліджень ISAAC на початку 2000-х atopічний дерматит (далі – АД) був у 3-6% дітей (Duda, & Okhotnikova, 2018), а у 2020 р. зустрічався від 9,0% до 28,5% серед дитячого населення регіонів України. Наприклад в одному з досліджень захворюваність на АД серед дітей Києва становила 10,1% (2018-2020 рр.) (Yevtushenko, Litus, Litus, & Kovalenko, 2023). Контактний дерматит (далі – КД) також є поширеним. Згідно даних МОЗ за 2005 р. було 749,4 випадки на 100 тис. населення. Усі ці показники зазвичай вищі у дітей і жінок (через побутові контакти з алергенами) порівняно з дорослими чоловіками. За дослідженнями доведено, що найчастіше дерматити реєструються у віці до 2 років, з підліткового віку їх частота поступово зменшується (Yevtushenko, Litus, Litus, & Kovalenko, 2023).

Псоріаз – хронічне запальне захворювання шкіри, що уражає близько 2-3% населення світу. За даними Центру громадського здоров'я за 2020 рік, в Україні

майже 1,5 млн людей живуть з псоріазом ($\approx 3\%$ населення). Ураження шкіри може початися в будь-якому віці, але зазвичай до 30 років, розвиток не залежить від статі. Таким чином псоріаз уражає чоловіків та жінок у приблизно рівній мірі (Melnyk та ін., 2022).

3.2.2 Аналіз сучасних косметичних засобів, що застосовуються при запальних ураженнях шкіри

Таблиця 3.1

Протизапальні засоби для проблемної шкіри

Бренд	Країна походження	Приклад засобу	Об'єм засобу, мл	Курс застосування ***	Витрата за курс, г	Ціна упаковки, грн	Вартість курсу, грн	Джерело інформації (1,2,3,4...)**
La Roche-Posay	Франція	Effaclar Duo+ гель-крем (для обличчя)	40	Безстроково (щодня)	~30	699*	524	1
Bioderma	Франція	Sebium Global крем (для обличчя, 8+)	30	Безстроково (щодня)	~30	533*	533	2
Avene	Франція	Cicalfate+ крем відновлювальний (для обличчя/тіла)	40	21 день	~21	527*	277	3
Some By Mi	Південна Корея	АНА/ВНА/РНА 30 Days Miracle Cream (для обличчя)	60	30 днів (курс)	~30	720*	360	4
CeraVe	США	SA Smoothing Cream крем (для обличчя/тіла)	177	Безстроково (щодня)	~30	493*	85	5
Hillary	Україна	Anti-Acne Salicylic Bode Wash (гель для тіла)	200	Безстроково (щодня)	~30	467*	70	6

Примітка. *- Ціни наведено станом на 19.05.2025. **- 1 - <https://ezebra.com.ua/uk/products/dogliad/dogliad-za-oblichchiam/kremi/la-roche-posay-effaclar-duo-krem-dlia-borot-bi-z-nedoskonalostiami-40ml-86305.html?srsId=AfmBOoqccv3NqQED2A0nm9Nf8zBczsaZ3D8rhsxEp9RIv1Snmc5d8YAd>; 2 - https://makeup.com.ua/ua/product/67265/?gad_source=1&gad_campaignid=17593693380&gclid=CjwKCAjwrvavBBhBjEiwAIr30VBaY1xIz_OJiiIMDfR49qqzIYT

5-WxTFDgG0a6-4VqPfyGJdJc9AYBoCHOUQAvD_BwE; 3 - https://ezebra.com.ua/ru/products/uhod/uhod-za-licom/kremy/avene-cicalfate-zashchitnyi-regeneriruiushchii-krem-40ml-102839.html?srsltid=AfmBOooLr_MKVwrSBhbF-kiubRqUMD7A_3tcuQqM5C6LnJi6v2LwxdFT#:~:text=; 4 - <https://makeup.com.ua/ua/product/575935/#:~:text=863%20%20%E2%82%B4>; 5 - https://citruspharm.com.ua/tserave-cerave-pom-yakshuvalniy-krem-dlya-suhoyi-zagrubiloyi-ta-nerivnoyi-shkiri-oblichchya-y-tila-177-ml-p124351?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=%5Bs%5D; 6 - <https://makeup.com.ua/ua/product/1468563/#:~:text=467%20%20%E2%82%B4>. ***- Курс застосування або рекомендована тривалість указані інструкцією (для Avene – використовують 2 рази на день протягом 21 дня, для Some By Mi – використовують курсом 30 днів), інші засоби – не мають точної рекомендації застосування, розраховані для щоденного користування до покращення стану шкіри. Витрата на курс розрахована як ~1 г/день (за умови одноразового нанесення чи середньої норми) помножена на дні курсу (взято середнє значення у 30 днів).

Розрахунок вартості курсу.

La Roche-Posay. Effaclar Duo+ (40 мл, 699 грн): $699 \text{ грн}/40 \text{ мл} = 17.48 \text{ грн/мл}$. За 30 днів (30 г) = $17.48 \times 30 = 524 \text{ грн}$.

Bioderma. Sebium Global (30 мл, 533): Припускаємо курс 30 днів (30 г) = $533/30 \times 30 = 533 \text{ грн}$.

Avene. Cicalfate+ (40 мл, 527 грн): $527 \text{ грн}/40 \text{ мл} = 13.18 \text{ грн/мл}$. За 21 днів (21 г) = $13.18 \times 21 = 277 \text{ грн}$.

Some By Mi. АНА/ВНА/РНА 30 Days Miracle Cream (60 мл, 720 грн): $720 \text{ грн}/60 \text{ мл} = 12 \text{ грн/мл}$. За 30 днів (30 г) = $12 \times 30 = 360 \text{ грн}$.

CeraVe. SA Smoothing Cream (177 мл, 493 грн): $493 \text{ грн}/177 \text{ мл} = 2.82 \text{ грн/мл}$. За 30 днів (30 г) = $2.82 \times 30 = 85 \text{ грн}$.

Hillary Anti-Acne Salicylic Bode Wash (200 мл, 467 грн): $467 \text{ грн}/200 \text{ мл} = 2.34 \text{ грн/мл}$. За 30 днів (30 г) = $2.34 \times 30 = 70 \text{ грн}$.

3.2.3. Ферментативний синтез фенетилового ефіру кавової кислоти та його перспективи у дерматокосметології

Фенетиловий ефір кавової кислоти (далі – CAPE) – це біологічно активний ефір, що природньо міститься у прополісі (рис. 5). Він був ідентифікований ще у 1987 році та хімічно синтезований у 1988 році у Колумбійському університеті. Молекулярна формула даної сполуки – $C_{17}H_{16}O_4$ (Olgierd, Kamila, Anna, & Emilia, 2021).

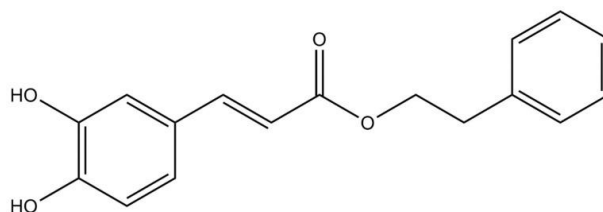


Рис. 5 Хімічна будова фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE) (Olgierd, Kamila, Anna, & Emilia, 2021)

CAPE має ряд важливих біологічних властивостей, як наприклад протизапальна, антиоксидантна, протиракова та ранозагоювальна активність. Ефір здатен до модуляції різних запальних шляхів та є потужним, і специфічним інгібітором транскрипційного фактору НК-кВ, який відіграє ключову роль у регуляції імунної відповіді організму на інфекції. Сполуки, що мають вплив на активацію даного фактору мають значний терапевтичний потенціал, адже активація НК-кВ є критичним етапом запального каскаду (Olgierd, Kamila, Anna, & Emilia, 2021).

Традиційно фенетиловий ефір кавової кислоти отримують методом екстракції, або хімічної естерифікації, що вимагає доволі жорстоких умов та реактивів. Альтернативою хімічному синтезу є ферментативна естерифікація кавової кислоти з 2-фенілетанолом. Для цього використовують фермент ліпазу як каталізатор реакції, зважаючи на високу температуру проведення реакції та на використання органічних розчинників, доцільним є використання рекомбінантних ліпаз (наприклад рекомбінантної ліпази на основі генів *Geobacillus* sp. ID17). Ферменти забезпечують можливість проведення реакції у м'яких умовах, не вимагаючи кислот чи основ і дають чистий продукт без утворення побічних сполук (Tripon, Tulcan, Marc, Camen, & Paul, 2025).

Таким чином ферментативна естерифікація кавової кислоти (10 мг) 2-фенілетанолом у співвідношенні 1:92 (у безводному органічному розчиннику, наприклад ізооктані чи гексані), каталізована термостабільною ліпазою (50 мг) протягом 24 год при 60 °С, 1000 об/хв, призводить до 76.5% виходу ефіру.

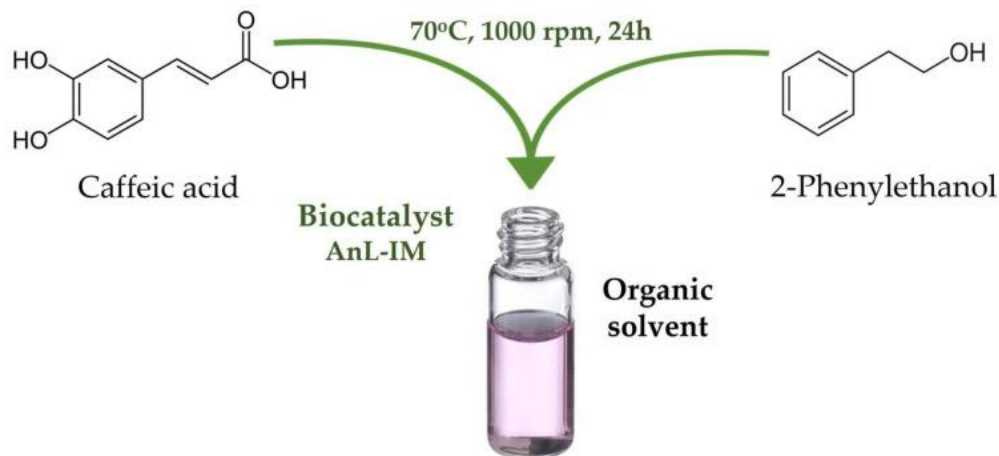


Рис. 6 Графічне зображення процесу синтезу CAPE за допомогою біокаталізу ліпазою в органічних розчинниках (Tripon, Tulcan, Marc, Camen, & Paul, 2025)

3.3. Розрахунок річної потужності виробництва

З огляду на наведену раніше статистику, цільова аудиторія для біотехнологічного продукту на основі фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE) та наночастинок срібла – це переважно люди з алергічно-запальними дерматозами, а також з хронічними дерматозами. Загалом приблизно 2,5 млн осіб мають запальні проблеми шкіри. Вже існуючі дані свідчать про високу частоту саме цих захворювань у вікових групах 12-60 років, приблизно 1,7 млн осіб, що підтверджує актуальність спрямування продукту на зазначені категорії суспільства. За бажано отриманий продукт взято тюбік крему об'ємом 30 мл. Витрата на курс розрахована як ~1 мл/день (за умови однократного нанесення чи середньої норми) помножена на дні курсу (взято середнє значення у 30 днів). Приймаємо що в середньому у 1 особи (12-60 років) запалення виникає 1 раз на 5 років. Приблизно 10 разів (60-12=48; 48/5=10) за цей період даний крем буде в нагоді людям з запаленнями шкіри. Зважаючи що на 1 курс використовується 30 мл, отже на даний період буде використовуватися приблизно 300 мл (10*30=300) крему на людину. Зважаючи на

великий вибір доглядової лікувальної косметики, беремо за ідею забезпечити 5% з 1,7 млн осіб.

$$1\,700\,000 \cdot 0,05 = 85\,000 \text{ осіб}$$

$$85\,000 \cdot 300 = 25\,500\,000 \text{ г крему (25,5 м}^3\text{)}.$$

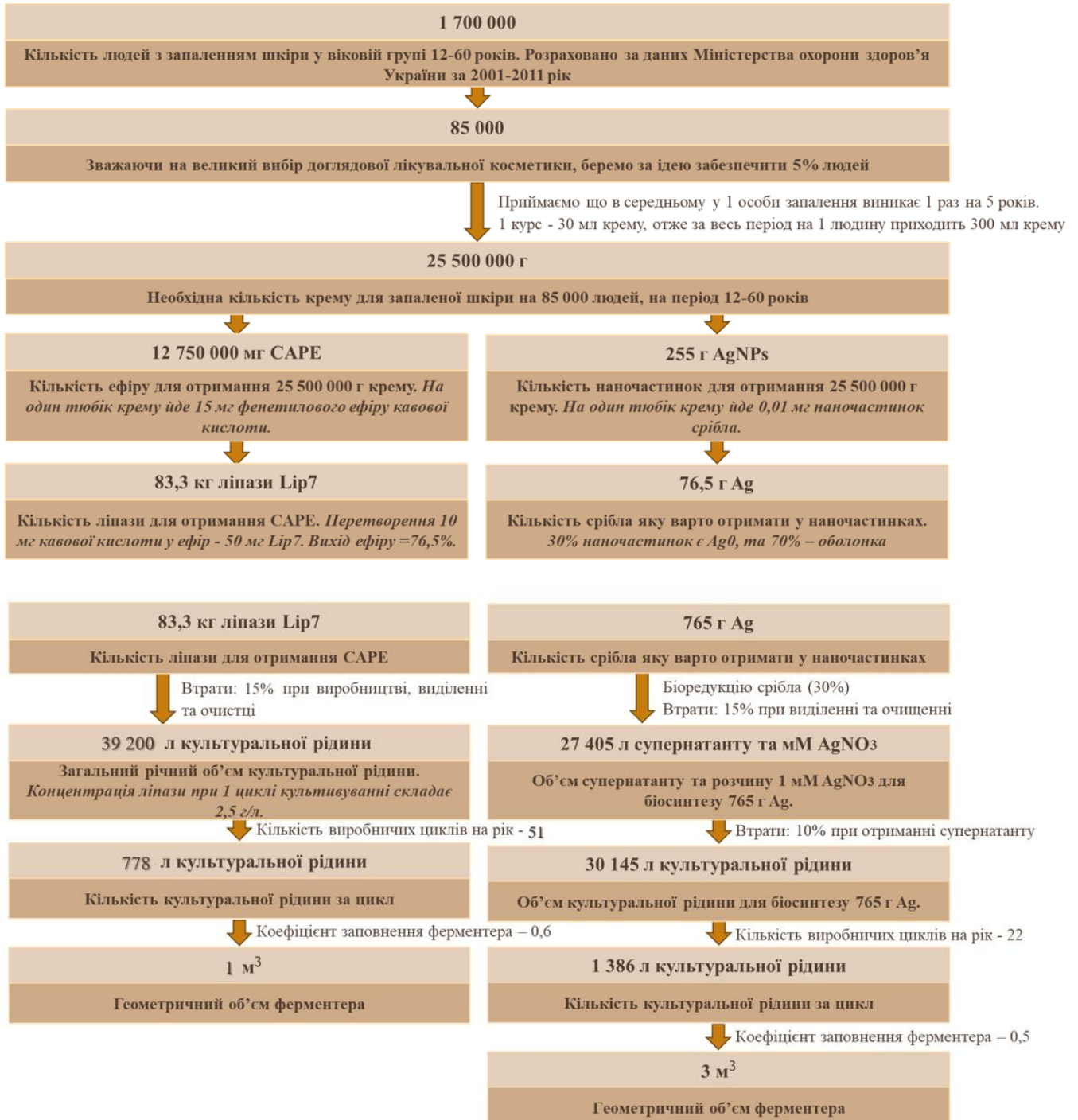


Рис. 3 Загальна схема техніко-економічного обґрунтування

Для фенетилового ефіру кавової кислоти.

На один тюбік крему (30 мл) йде 15 мг фенетилового ефіру кавової кислоти. Таким чином щоб виготовити 25 500 000 г крему потрібно 12 750 000 мг ефіру. Далі визначаємо скільки треба ліпази щоб отримати цю кількість ефіру (для естерифікації 10 мг кавової кислоти з 2-фенілетанолом беруть 50 мг ліпази Lip7, при цьому вихід ефіру становить 76,5%). Отже за умовою, для перетворення 10 мг кавової кислоти у ефір необхідно 50 мг Lip7. Спочатку знаходимо скільки кавової кислоти потрібно, а потім потрібну кількість – ліпази.

$$12\,750\,000/0,765=16\,666\,667 \text{ мг кавової кислоти.}$$

$$16\,666\,667*50/10=83\,333\,333 \text{ мг (83.3 кг) ліпази.}$$

Концентрація Lip7 при експресії у *E. coli* C41(DE3) становить ~2,5 г/л. Враховуємо втрати: 15% при виділенні та очищенні.

$$\text{Lip7 до виділення та очищення: } 83.3/(1-0,15)=98 \text{ кг.}$$

Далі обраховуємо об'єм культуральної рідини, необхідний для виробництва цієї маси Lip7 за концентрації 2,5 г/л:

$$98000/2,5=39\,200 \text{ л.}$$

Маємо загальний річний об'єм близько 39 200 л (39,2 м³).

Кількість трудоднів становитиме 90 днів, одже об'єм культуральної рідини за добу: $V_d = \frac{V_{\text{гп}}}{T_{\text{тр}}} = \frac{39\,200}{90} = 435,5 \text{ л}$

Підготовка ферментера включає в себе: огляд та миття (0,5 год), перевірку на герметичність (0,5 год), нагрівання апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища культивування (0,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год). Тривалість виробничого культивування – 34,5 год.

$$T_{\text{цф}} = 0,5 + 0,5 + 0,5 + 1 + 0,5 + 0,5 + 0,5 + 0,5 + 34,5 = 39 \text{ год}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл становитиме:

$$V_{\text{цк}} = \frac{K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 \times 435,5 \times 39}{24} = 778 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – робочий цикл ферментера, включно з тривалістю виробничого культивування (34,5 год) та часом підготовки, до роботи, ферментера (4,5 год); K_1 – коефіцієнт запасу, враховуючий можливість операцій в не стерильності ($K_1 = 1,1$).

Кількість циклів складатиме:

$$N_{цк} = \frac{V_{гп}}{V_{цк}} = \frac{39\,200}{778} \approx 51 \text{ цикл}$$

Визначаємо геометричний об'єм ферментера, розрахувавши $V_{цк}$ за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення: $V_{г} = V_{цк} / K_3 = 778 / 0,6 = 1296 \text{ л}$

Найближчим, підходящим, за геометричним об'ємом, є ферментер $V_{ф} = 1\text{ м}^3$.

Перевіримо, правильність вибору геометричного об'єму ферментера, через коефіцієнт заповнення: $K_3 = 778/1500 = 0,52$ – не перевищує заданого значення (0,6), що означає правильність вибору.

Для наночастинок срібла.

У косметичних засобах використовують доволі низькі концентрації наночастинок срібла (далі – AgNPs), приблизно 0,01 мг AgNPs на 1 г крему. Таким чином щоб виготовити 25 500 000 г крему потрібно 255 000 мг (255 г) наночастинок срібла.

Для подальшого розрахунку береться до уваги такі дані:

1. Наночастинки срібла синтезуються за допомогою супернатанту отриманого після центрифугування культури *Geobacillus Thermodenitrificans* AZ1 та додавання 1 мМ нітрату срібла (AgNO_3) (Youssif, Soliman, Sabry, & Ghozlan, 2020).

2. Наночастинки срібла мають структуру Ag^0 вкритих стабілізуючими білками, полісахаридами та іншими біологічно активними речовинами, що наявні у супернатанті. Варто враховувати, що 30% наночастинок є Ag^0 , та 70% – оболонка (Srikar та ін., 2016). Отже якщо необхідно синтезувати 255 г AgNPs, то 76,5 г буде складати чисте срібло.

3. Варто розрахувати потрібний об'єм супернатанту для отримання 76,5 г Ag у наночастинках.

1 мМ AgNO₃ використовується на 1 л супернатанту.

1 М AgNO₃ = 169,87 г/л, тоді 1 мМ AgNO₃ = 0,1699 г/л.

1 М Ag = 107,86 г, тоді 1 мМ 1 мМ AgNO₃ налічує в собі 0,107 Ag.

Враховуючи приблизну біоредукцію срібла (30%), визначаємо, що з 0,107 г Ag відновиться 0,0321 г. Тому для біосинтезу 76,5 г Ag має бути використано 2383 мМ AgNO₃ та відповідно стільки ж літрів супернатанту.

4. Варто врахувати втрати при виділенні та очистці (20%). Отже доцільним буде використання 3654 л супернатанту та мМ AgNO₃.

5. На етапах отримання супернатанту з культуральної рідини, також будуть втрати у 10%. Тому щоб отримати 2740,5 л супернатанту варто мати 4020 л культуральної рідини.

Отже враховуючи попередні дані, зазначено, що об'єм культуральної рідини для біосинтезу 255 г наночастинок срібла складатиме 4020 л (враховуючи втрати протягом культивування, виділення та очистки). Кількість трудоднів становитиме 100 днів, отже об'єм культуральної рідини за добу:

$$V_d = \frac{V_{\text{гп}}}{T_{\text{тр}}} = \frac{4020}{100} = 40,2 \text{ л}$$

Підготовка ферментера включає в себе: огляд та миття (0,5 год), перевірку на герметичність (0,5 год), нагрівання апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища культивування (0,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год). Тривалість культивування – 48 год, тривалість біосинтезу – 48 год.

$$T_{\text{цф}} = 0,5 + 0,5 + 0,5 + 1 + 0,5 + 0,5 + 0,5 + 0,5 + 48 + 48 = 100,5 \text{ год}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл становитиме:

$$V_{\text{цк}} = \frac{K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 \times 40,2 \times 100,5}{24} = 185 \text{ л/цикл}$$

де T_{цф} – робочий цикл ферментера, включно з тривалістю виробничого культивування та біосинтезу (96 год) та часом підготовки, до роботи, ферментера (4,5 год); K₁ – коефіцієнт запасу, враховуючий можливість операцій в не стерильності (K₁ = 1,1).

Кількість циклів складатиме:

$$N_{\text{цк}} = \frac{V_{\text{гп}}}{V_{\text{цк}}} = \frac{4020}{185} \approx 22 \text{ циклів}$$

Визначаємо геометричний об'єм ферментера, розрахувавши $V_{\text{цк}}$ за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення: $V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_3 = 185 / 0,5 = 370 \text{ л}$

Найближчим, підходящим, за геометричним об'ємом, є ферментер $V_{\text{ф}} = 400 \text{ л}$.

Перевіримо, правильність вибору геометричного об'єму ферментера, через коефіцієнт заповнення: $K_3 = 185/400 = 0,46$ – не перевищує заданого значення (0,5), що означає правильність вибору.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

4.1 Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

4.1.1 Підбір обладнання для лінії отримання ліпази Lip7

Таблиця 4.1

№	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (Разом 15%)	Вийшло	
ТП 3. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 3.1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	778 л	-	778 л	Збірник КР 1 м ³
ТП 4. Відокремлення біомаси						
2	ТП 4.1. Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	778 л	-	-	Центрифуга продуктивністю 2 м ³ /год
		Волога біомаса	$0,77 \cdot 2,5 = 1,93$ кг (АСБ) з урахуванням вологості 60% - 4,86 кг	-	4,86 кг	
		Супернатант	$778 - 4,86 = 773$ л	5%	773 л	Відводиться на утилізацію
ТП 5. Клітинна деструкція						
3	ТП 5.1. Ресуспендування біомаси	Волога біомаса	4,86 кг	-	-	Реактор змішувач об'ємом 50 л
		Електропораційне середовище	20 л	-	-	
		Клітинна суспензія	-	-	24,86 л	
4	ТП 5.2. Проведення клітинної деструкції за допомогою PEF	Клітинна суспензія	24,86 л	-	-	Промислова установка імпульсивного електричного поля
		Клітинний лізат	-	-	24,86 л	

НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Васильєва О.Л.						
Перевір.		Скроцька О.Л.					59	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ТП 6. Теплова денатурація з попередньою інкубацією з CaCl₂						
5	ТП 6.1. Інкубація клітинного лізату	Клітинний лізат	24,86 л	-	-	Реактор змішувач об'ємом 50 л
		0,5 мМ розчин CaCl ₂	0,42 л	-	-	
		Суміш лізату з CaCl ₂	-	-	25,28 л	
6	ТП 6.2. Теплова денатурація	Суміш лізату з CaCl ₂	25,28 л	-	-	(Той самий реактор)
		Нагрітий лізат з CaCl ₂	-	-	25,28 л	
ТП 7. Відокремлення денатурованих білків						
7	ТП 7.1 Центрифугування	Нагрітий лізат з CaCl ₂	25,28л	-	-	Промислова центрифуга безперервної дії продуктивністю 50 л/год
		Осад	-	-	1,27 кг	Відводиться на утилізацію
		Надосадова рідина	-	5%	24,01 л	Проміжний збірник об'ємом 50 л
ТП 8. Імобілізація ферменту						
8	ТП 8.1 Включення ліпази в поліакриламідний гель	Частково очищений розчин ліпази (надосадова рідина)	24,01 л	-	-	Реактор об'ємом 50 л
		Розчин мономерів	24,01л	-	-	
		Гелева суміш	-	-	48,02 л	
9	ТП 8.2 Формування та промивання гранул	Гелева суміш	48,02 л	-	43,5 л	Відводиться на утилізацію
		Імобілізована ліпаза	-	5%	1,63 кг	Гранулятор
ТП 9. Висушування гранул ферменту						
10	ТП 9.1 Висушування гранул ферменту	Імобілізована ліпаза	1,63 кг	-	-	Вакуумна сушарка
		Імобілізована ліпаза (готовий фермент)	-	-	1,63 кг	
ТП 10. Пакування та зберігання імобілізованого ферменту						
11	ТП 10.1 Пакування та зберігання	Імобілізована ліпаза	1,63 кг	-	1,63 кг	На склад

4.1.2 Підбір обладнання для лінії отримання наночастинок срібла

Таблиця 4.2

№	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (Разом 20%)	Вийшло	
ТП 2. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 2.1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	185 л	-	185 л	Збірник об'ємом 200 л
ТП 3. Отримання супернатанту						
2	ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	185 л	-	-	Центрифуга продуктивністю 500 л/год
		Супернатант	-	-	179 л	
		Біомаса	-	3%	5,56 г	
ТП 4. Біосинтез наночастинок срібла						
3	ТП 4.1. Біосинтез наночастинок срібла	Супернатант	179 л	-	-	Реактор об'ємом 300 л
		1 М розчин AgNO ₃	179 мл	-	-	
		Реакційна суміш	179 л + 179 мл = 134,2 л	-	180 л	
ТП 5. Трьохразове ультрацентрифугування						
4	ТП 5.1. Центрифугування та ультрацентрифугування	Реакційна суміш	180 л (1 л (подачі))	-	-	Центрифуга 500 об/хв
		Осад AgNPs	-	11% (за 3 повторі)	13,7 г	Ультрацентрифуга 10000 об/хв
		Супернатант	-	-	166,3	
5	ТП 5.2. Промивання наночастинок срібла	Осад AgNPs	13,7 г	-	-	Реактор об'ємом 200 л
		Дистильована вода	1 л	-	-	
		Ресуспендовані AgNPs	-	-	1 л (13 г після 3 повторів)	
ТП 6. Сублімаційна сушка						
6	ТП 6.1. Сублімаційна сушка	Очищена суспендія AgNPs	1 л	-	-	Ліофілізатор
		Сухий порошок AgNPs	-	5%	12,4 г	
ТП 7. Подрібнення						
7	ТП 7.1. Подрібнення	Сухий порошок AgNPs	12,4 г	-	-	Барабанний млин
		Подрібнений порошок AgNPs	-	1%	12,2 г	

ТП 8. Просіювання						
8	ТП 8.1 Просіювання	Подрібнений порошок AgNPs	12,2 г	-	-	Повітряне струминне сито
		Просіяний порошок AgNPs	-	1%	12 г	
ТП 9. Пакування та зберігання						
9	ТП 9.1 Пакування та зберігання	Просіяний порошок AgNPs	12 г	-	12 г	На склад

4.2 Специфікація обладнання

4.2.1 Специфікація обладнання для лінії отримання ліпази Lip7

Таблиця 4.3

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)	Посилання *
Д-1	Технічні ваги	1	Технічні ваги Helmac NWL (METAS). Максимальне навантаження: 30 кг. Платформа з нержавіючої сталі розміром 235×335 мм	1
Р-2, Р-3, Р-4, Р-5, Р-6 Р-11, Р-15, Р-19	Реактор змішувач	7	Реактор змішувач 50 л. (Завод технологічного обладнання). Під замовлення може бути оснащений мішалкою та теплоізолюючою сорочкою, датчиками: рН, O ₂ , рівню рідини та температури.	2
З-7	Збірник	1	Збірник об'ємом 1 М ³ на замовлення (Gaoyou Yuhang Chemical Machinery Factory). Матеріал: Нержавіюча сталь (SS316L). Товщина 4 мм. Оснащений мішалкою та теплоізолюючою сорочкою, датчиками: рН, O ₂ , рівню рідини та температури. Габаритні розміри: висота 1750, діаметр 1100 мм	3
Н-8, Н-10, Н-12, Н-14, Н-16, Н-18	Насос	5	Перистальтичний насос MP-8035.16 (DEBEM). Продуктивність = 500 л/год; матеріал трубки – Norgprene;	4
Ц-9	Центрифуга	1	Декантерна центрифуга (Fenix Process Technologies Private Limited) Нержавіюча сталь, Продуктивність 2 м ³ /год, Габарити: 2800×1500×1000 мм	5
УІЕП-13	Установка імпульсного електричного поля	1	Установка імпульсного електричного поля Pulsemaster Solidus PEF (Pulsemaster). Діапазон потужності до 100 кВт.	6

Закінчення таблиці 4.3

Ц-17	Центрифуга	1	Декантерна центрифуга (Suzhou Hemho Centrifuge Co., Ltd.). Нержавіюча сталь. Максимальна швидкість 10000 об/хв. Продуктивність 50 л/год. Габарити: 650×400×500 мм.	7
ГР-20	Гранулятор	1	Гранулятор (Zhengzhou Meijin Machinery Equipment Co., Ltd.). Продуктивність: 36 кг/год.	8
С-21	Вакуумна сушарка	1	Шафа сушильна вакуумна СВ-30 («UOSLAB») Розміри робочої камери, з урахуванням фальш-панелі 300х300х370 мм. Максимальне завантаження полиці, 14 кг	9

*Посилання: 1-<https://metas.ua/prod/fasuvalni-vagy-helmac-nwl/>; 2-<https://prom.ua/ua/p133617469-reaktor-smesitel.html>; 3-https://www.alibaba.com/product-detail/100L-200L-500L-1000L-Vertical-304_1601244057134.html; 4-<https://pumpcentre.com.ua/peristalticheskij-nasos-mp-803516/>; 5-<https://www.indiamart.com/proddetail/decanter-centrifuge-25239820797.html?srsltid=AfmBOoo7J7o4naX8lyZY-vNmmGb0-ry2nQTKc5VEaWJ6UbB4BS4Hm5hO>; 6-<https://www.pulsemaster.us/pef-machinery>; 7-https://www.alibaba.com/product-detail/Small-Lab-Scale-500L-H-Laboratory_1600398675592.html; 8-https://www.alibaba.com/product-detail/Stainless-Steel-Dry-Powder-Disc-Granulator_1600999600879.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.53a013a0GmNeI3; 9-<https://uoslab.com/sushylne-obladnannia/vakuumni-shafy/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-sv-30>

4.2.2 Специфікація обладнання для лінії отримання наночастинок срібла

Таблиця 4.4

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)	Посилання *
Р-1	Реактор	1	Реактор на 30 л (Henan Lanphan Technology Co., Ltd.). Нержавіюча сталь. Оснащений мішалкою та теплоізолюючою сорочкою, датчиками: рН, O ₂ , рівню рідини та температури Габарити: 540×540×1260 мм	1
Д-2	Технічні ваги	1	Технічні ваги Helmac NWL (METAS). Максимальне навантаження: 20 кг. Платформа з нержавіючої сталі розміром 235×335 мм	2
З-3	Збірник	2	Збірник об'ємом 200 л (Gaoyou Yuhang Chemical Machinery Factory). Матеріал: Нержавіюча сталь (SS316L). Товщина 4 мм. Оснащений мішалкою та теплоізолюючою сорочкою, датчиками: рН, O ₂ , рівню рідини та температури. Габаритні розміри: висота 2200, діаметр 1300 мм	3

Закінчення таблиці 4.4

Н-4, Н-6, Н-8, Н-10, Н-12, Н-14	Насос	6	Перистальтичний насос MP-8035.16 (DEBEM). Продуктивність = 500 л/год; матеріал трубки – Norprene;	4
Ц-5	Центрифуга	1	Декантерна центрифуга (Suzhou Hemho Centrifuge Co., Ltd.). Нержавіюча сталь. Максимальна швидкість 6000 об/хв. Продуктивність 500 л/год. Габарити: 650×400×500 мм.	5
Р-7	Реактор	1	Реактор на 300 л (DEVELOPMENT TECHNOLOGY COMPANY LIMITED) під замовлення. Нержавіюча сталь SUS316. Оснащений мішалкою (до 2000 об/хв) та теплоізолюючою сорочкою, датчиками: рН, O ₂ , рівню рідини та температури.	6
Ц-9	Центрифуга	1	Центрифуга (MICROmed) Нержавіюча сталь. Максимальна швидкість 4200 об/хв. Ємність 4200 мл. Габарити: 74×84×64 см.	7
Р-11	Реактор	1	Реактор на 200 л (DEVELOPMENT TECHNOLOGY COMPANY LIMITED) під замовлення. Нержавіюча сталь SUS316. Оснащений мішалкою (до 2000 об/хв).	6
УЦ-13	Ультрацентрифуга	1	Ультрацентрифуга TMAX-H2050R (TMAX). MAX: 10000 об/хв. Потужність: 1500 Вт. Габарити: 560×800×440 мм. Вага: 95 кг	8
СС-15	Ліофілізатор	1	Сублімаційна сушарка FD-10F (LANFREEZ). Партім 1-3 кг. Ємність для видалення льоду конденсатора 6 кг/24 год. Габарити: 655×640×1200 мм.	9
БМ-16	Барабанний млин	1	Барабанний млин ТМ 500 («Retsch»). Вихідний розмір частинок <20 мм. Кінцева точність <15 мкм. Матеріал розмольної гарнітури скаленна сталь, нержавіюча сталь. 1100 x 1604 x 936 мм	10
ПС-17	Повітряне струмне сито	1	Повітряний струменевий шейкер (Changsha Mitr Instrument Equipment Co., Ltd.). Розмір часток: 3 мкм -4 мм. Швидкість: 5-55 об/хв. Габарити: 460×288×305 мм.	11

*Посилання:

1-[https://www.alibaba.com/product-detail/10l-20l-30l-50l-100l-150l_1600988017897.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1a5013a002L8Pk](https://www.alibaba.com/product-detail/10l-20l-30l-50l-100l-150l_1600988017897.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1a5013a002L8Pk;); 2-
<https://metas.ua/prod/fasuvalni-vagy-helmac-nwl/>; 3- https://www.alibaba.com/product-detail/100L-200L-500L-1000L-Vertical-304_1601244057134.html; 4-<https://pumpcent.re.com.ua/peristalticheskiy-nasos-mp-803516/>; 5-
https://www.alibaba.com/product-detail/Small-Lab-Scale-500L-H-Laboratory_1600398675592.html; 6-
https://www.alibaba.com/product-detail/Steam-Heat-Stirred-Tank-Batch-Reactor_1600963589518.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.7cf413a0w6FeHb; 7-

https://profmedmarket.com/vracham-ii-meediiciinskiim-uchreezhdeeniiyam/laboratornoee-oborudovaniiee-4/obshcheelaboratornoee-oborudovaniiee-1/ceentriifugii-1/ceentriifugii-meediiciinskiiee-micromed-ukraiina-2/centryfuga-refryzheratornaya-pc-6-plasma-s-ohlazhdenyem/?utm_source=google&utm_campaign=18524243273&utm_medium=cpc&gclid=CjwKCAiAraXJBhBJEiwAjj7MZSur2DSEmdxqtGbQpsV7bHF_8EuiPGvF-7ABDuuep7D2TUzu7iA9ZBoCG9AQAvD_BwE8-
https://www.tmaxlaboratory.com/tabletop-high-speed-refrigerated-centrifuge-install-and-remove-without-tool_p477.html;
9-<https://www.labfreez.com/fd-10f-series-pilot-freeze-dryer-electric-heating-food-medical/>; 10-
https://www.macrolab.com.ua/catalog/preparation_of_laboratory_tests/laboratorni_mlyny/Planetarni_mlyny/TM500/; 11-
https://www.alibaba.com/product-detail/MITR-Laboratory-Soil-Testing-Vibrating-Sieve_1601411442823.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.42db13a0GdQB1D.

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Опис технологічної схеми процесу виділення та очищення ліпази Lip7

Технологічна схема процесу виділення та очищення ліпази Lip7 складається з допоміжних робіт («ДР» – стадії приготування буферних розчинів та реагентів, приготування компонентів для іммобілізації) та технологічних процесів («ТП» – зберігання культуральної рідини, відокремлення біомаси, клітинна деструкція, теплова денатурація з попередньою інкубацією з CaCl₂, Відокремлення денатурованих білків, іммобілізація, сушка, зберігання).

ДР 1. Приготування буферних розчинів та реагентів

ДР 1.1. Приготування 50 мМ фосфатного-сольового буферу

Для ресуспендування біомаси та подальших етапів очищення готують фосфатний буфер. 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.76 мМ KH₂PO₄ зважують на промислових вагах (Д-1) та розчиняють у деіонізованій воді у реакторі-змішувачі (Р-2). рН розчину доводять до 8.0 гідроксидом натрія.

Контроль: Хімічний (рН, концентрація компонентів).

ДР 1.2. Приготування 1 М розчину CaCl₂

Для стабілізації ліпази готують концентрований вихідний розчин хлориду кальцію. CaCl₂ зважують на промислових вагах (Д-1) та розчиняють у деіонізованій воді у реакторі-змішувачі (Р-3). Цей розчин буде використаний для підготовки 0,5 мМ робочого розчину безпосередньо перед інкубацією.

Контроль: Хімічний (концентрація розчину).

ДР 1.3. Приготування електропораційного середовища

Для ефективного лізису клітин методом PEF готують спеціальне середовище. Зважують компоненти: сахарозу (242 мМ), Na₂HPO₄ (5,5 мМ), NaH₂PO₄ (3 мМ), MgCl₂ (1,7 мМ) та розчиняють у деіонізованій воді у реакторі-змішувачі (Р-4).

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Васильєва О.Л.			РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.Л.					66	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Контроль: Хімічний (концентрація компонентів).

ДР 2. Приготування компонентів для іммобілізації в поліакриламідний гель

ДР 2.1. Приготування розчину акриламіду та бісакриламіду

Для формування поліакриламідного гелю готують розчин мономерів. Акриламід (54 кг) та бісакриламід (3,6 кг) зважують на вагах (Д-1) та розчиняють у фосфатному буфері (ДР 1.1) у реакторі-змішувачі (Р-5). Концентрація мономерів (7,5 г акриламіду та 0,5 г бісакриламіду на 25 мл буферу) оптимізуються для досягнення бажаного розміру пор гелю та ефективного утримання ферменту.

Контроль: Хімічний (концентрація мономерів).

ДР 2.2. Приготування розчину амоній персульфату (APS)

Амоній персульфат, ініціатор вільнорадикальної полімеризації, готують щодня для забезпечення максимальної ефективності. Необхідну кількість APS (50 мг на 50 мл загального розчину) зважують та розчиняють у деіонізованій воді у реакторі-змішувачі (Р-6). Розчин зберігають у прохолодному місці до використання, щоб запобігти передчасній деградації.

Контроль: Хімічний (концентрація розчину).

ТП 3. Зберігання культуральної рідини

ТП 3.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина (778 л), після завершення біосинтезу надходить до збірника (З-7). Де зберігається при температурі 4°C для мінімізації деградації ферменту та підтримання життєздатності клітин до подальшої обробки. Це забезпечує стабільність цільового продукту перед початком виділення.

Контроль: Технологічний (температура зберігання), Мікробіологічний (відсутність контамінації).

ТП 4. Відокремлення біомаси

ТП 4.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина (778 л) зі збірника (З-7) подається перистальтичним насосом (Н-8) до промислової центрифуги (Ц-9) безперервної дії. Біомасу *E.coli*

відокремлюють шляхом центрифугування при 6000 об/хв протягом 30 хвилин. Супернатант, що містить культуральне середовище, відводиться на утилізацію, а біомаса збирається для подальшої обробки.

Контроль: Технологічний (швидкість, час центрифугування).

ТП 5. Клітинна деструкція

ТП 5.1. Ресуспендування біомаси

Отриманий клітинний осад переносять перистальтичним насосом (Н-10) у окремий реактор-змішувач (Р-11) та ресуспендують у заздалегідь підготовленому електропораційному середовищі (ДР 1.3). Концентрацію клітин доводять до оптимального значення 1 ОД для ефективної обробки РЕФ. Це забезпечує рівномірний розподіл клітин для подальшого лізису.

Контроль: Технологічний (оптична густина клітин), Хімічний (рН середовища).

ТП 5.2. Проведення клітинної деструкції за допомогою РЕФ

Клітинна суспензія подається насосом (Н-12) до промислової установки імпульсного електричного поля (УІЕП-13). Застосовуються імпульси високої напруги 10-18 кВ/см, тривалістю 1-20 мкс, з кількістю імпульсів 26-60. Цей метод ефективно руйнує клітинні мембрани *E.coli*, вивільняючи внутрішньоклітинну ліпазу Lip7, при мінімальному підвищенні температури та збереження цілісності ферменту.

Контроль: Технологічний (параметри РЕФ: напруженість, тривалість, кількість імпульсів), Мікробіологічний (ефективність лізису клітин).

ТП 6. Теплова денатурація з попередньою інкубацією з CaCl₂

ТП 6.1. Інкубація клітинного лізату

Отриманий клітинний лізат переносять у окремий реактор-змішувач (Р-15) перистальтичним насосом (Н-14) та додають 1М CaCl₂ (ДР 1.2) до досягнення кінцевої концентрації 0,5 мМ. Суміш змішують та інкубують протягом 15 хвилин за 25°C. Іони кальцію зв'язуються з ліпазою, що суттєво підвищує її термостійкість.

Контроль: Технологічний (температура, час інкубації), Хімічний (кінцева концентрація CaCl₂).

ТП 6.2. Теплова денатурація

Після інкубації з CaCl_2 , лізат нагрівають до $60\text{ }^\circ\text{C}$ і витримують протягом 30 хвилин. Етап забезпечує осадження більшості термолабільних білків клітини, що денатурують при цій температурі. Термостабільна ліпаза залишається розчинною та активною.

Контроль: Технологічний (температура, час термічної обробки), Хімічний (активність ліпази після денатурації).

ТП 7. Відокремлення денатурованих білків

ТП 7.1 Центрифугування

Суміш після теплової денатурації подається перистальтичним насосом (Н-16) до промислової центрифуги (Ц-17). Центрифугування проводять при 6000 об/хв, протягом 30 хвилин. Це дозволяє відокремити осаджені денатуровані білки та клітинні фрагменти від розчинної ліпази. Надосадова рідина, що містить частково очищену ліпазу Lip7, обережно збирається та перекачується насосом (Н-18) до реактору (Р-19), для збереження до подальших етапів іммобілізації. Осад денатурованих компонентів утилізується.

Контроль: Технологічний (швидкість, час центрифугування), Хімічний (активність ліпази).

ТП 8. Іммобілізація ферменту

ТП 8.1 Включення ліпази в поліакриламідний гель

Розчин частково очищеної ліпази змішують з розчином мономерів акриламідну та бісакриламідну (ДР 2.1) у окремому реакторі (Р-18). Полімеризацію ініціюють додаванням APS (ДР 2.2) та TEMED (ДР 2.3). Суміш обережно перемішують та переміщують до гранулятора (ГР-20) для формування гранул. Процес полімеризації відбувається при кімнатній температурі ($23\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$) протягом години.

Контроль: Технологічний (час реакції), Хімічний (активність іммобілізованого ферменту).

ТП 8.2 Формування та промивання гранул

У грануляторі (ГР-19) відбувається формування поліакриламідних гранул з інкапсульованою ліпазою. Отримані гранули розміром 1 мм ретельно

промиваються буфером та деіонізованою водою, для видалення неінкапсульованого ферменту та непрореагованих мономерів.

Контроль: Технічний (розмір гранул), Хімічний (ефективність іммобілізації, кількість неінкапсульованого ферменту).

ТП 9. Висушування гранул ферменту

ТП 9.1 Висушування гранул ферменту

Іммобілізовані гранули ліпази направляються у вакуумну сушарку (С-21) для м'якого низькотемпературного випарювання вологи за рахунок пониженого тиску (10 год, w=10%).

Контроль: Технологічний (час реакції, кількість в кг продукту)

ТП 10. Пакування та зберігання іммобілізованого ферменту

ТП 10.1 Пакування та зберігання

Сухі іммобілізовані гранули ліпази фасуються у контейнери які потім транспортуються до холодильного складу. Зберігання здійснюється при 4°C для забезпечення довготривалої стабільності ферменту та готовності до використання у виробництві косметичних засобів.

5.2. Опис технологічної схеми процесу виділення та очищення наночастинок срібла

Технологічна схема процесів виділення та очищення наночастинок срібла складається з допоміжних робіт («ДР» – стадії підготовки розчину нітрату срібла) та технологічних процесів («ТП» – зберігання культуральної рідини, отримання супернатанту, біосинтез наночастинок срібла, ультрацентрифугування, промивання наночастинок срібла, сублімаційна сушка, подрібнення, просіювання, пакування та зберігання).

ДР 1. Підготовка та стерилізація розчину нітрату срібла

ДР 1.1 Приготування та стерилізація розчину нітрату срібла

Для біосинтезу наночастинок срібла у окремому реакторі (Р-1) готують розчин нітрату срібла (AgNO_3) з кінцевою концентрацією 1 М. Оскільки 1 мМ $\text{AgNO}_3 = 1 \text{ мл } 1 \text{ М } \text{AgNO}_3$. Наважку у 30,8 г AgNO_3 зважують на технологічних

вагах (Д-2) та розчиняють в 179 мл деіонізованої води. Стерилізація проходить за 130°C, P = 0,15 МПа; 40 хв у реакторі.

Контроль: Хімічний (концентрація AgNO₃), мікробіологічний (відсутність мікробіоти), технологічний (температура, тиск, час стерилізації).

ТП 2. Зберігання культуральної рідини

ТП 2.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина об'ємом 185 л зберігають у окремому збірнику (З-3), при температурі 4°C.

Контроль: Технологічний (температура), мікробіологічний (відсутність сторонньої мікробіоти).

ТП 3. Отримання супернатанту

ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину за допомогою перистальтичного насоса (Н-4) переміщують у промислову центрифугу безперервної дії (Ц-5). Центрифугування проводять при 6000 об/хв протягом 30 хвилин. Ця швидкість та час забезпечують ефективно відділення бактеріальної біомаси від супернатанту, який є джерелом біомолекул для синтезу AgNPs.

Контроль: Технологічний (швидкість та час центрифугування).

ТП 4. Біосинтез наночастинок срібла

ТП 4.1. Біосинтез наночастинок срібла

Супернатант (179 л) перекачують насосом (Н-6) в окремий реактор для біосинтезу (Р-7). Додають розчин нітрату срібла (AgNO₃) (ДР 1.1) до кінцевої концентрації 1мМ. Реакцію проводять при температурі 55 °С, зі швидкістю перемішування 200 об/хв протягом 48 годин, в умовах без доступу світла. Зміна кольору розчину з світло-коричневого на темно-коричневий свідчить про утворення AgNPs.

Контроль: Технологічний (температура, швидкість перемішування та забезпечення повної відсутності світла), Хімічний (моніторинг утворення AgNPs за допомогою УФ спектрофотометрії (характерний пік поглинання 420-430 нм)).

ТП 5. Центрифугування та ультрацентрифугування

ТП 5.1. Центрифугування

Супернатант після біосинтезу насосом (Н-8) перекачують в центрифугу (Ц-9). Проводять центрифугування великого розчину при 4200 об/хв протягом 20 хв.

ТП 5.2. Промивання наночастинок срібла

Осаджені наночастинок срібла перекачують перистальтичним насосом (Н-10) з центрифуги (Ц-9) там ресуспендують в дистильованій воді у окремому реакторі (Р-11). Промиті наночастинок подають насосом (Н-12) в ультрацентрифугу (УЦ-13) та піддають ультрацентрифугуванню. Цей етап повторюють 2 рази для досягнення високого рівня чистоти. За час другого промивання, ультрацентрифуга піддається оцистці.

Контроль: Технологічний (трьохкратне промивання).

ТП 5.3. Ультрацентрифугування

Ультрацентрифугування проводять при 10000 об/хв протягом 15 хвилин для концентрації та подальшої очистки наночастинок срібла від дрібних домішок та розчинених біомолекул.

Контроль: Технологічний (швидкість та час центрифугування), Хімічний (УФ спектроскопія для оцінки концентрації AgNPs в осаді, динамічне розсіювання світла для контролю заміру та розподілу частинок).

ТП 6. Сублімаційна сушка

ТП 6.1. Сублімаційна сушка

Очищену суспензію наночастинок срібла переміщують у флакони для сублімаційної сушки. Перед заморожуванням до суспензії додається дистильована вода (як розчинник для ресуспендування концентрованого осаду) для забезпечення належної дисперсії та формування однорідної структури під час заморожування. Продукт заморожується у ліофілізаторі (СС-15) до температури нижче точки евтектики (-40 °С), що забезпечує повне перетворення води на лід. Після заморожування тиск у камері знижують до 50 мкбар, і починається сушка (сублімація льоду) при контрольованій температурі 20-30 °С. Цей процес дозволяє видалити близько 95% води. Потім проводиться вторинна сушка, під час якої

температура підвищується для видалення залишкової зв'язаної води, що забезпечує низьку залишкову вологість (1-5%) та довготривалу стабільність AgNPs.

Контроль: Технологічний (температура та тиск у камері ліофілізатора).

ТП 7. Подрібнення

ТП 7.1. Подрібнення

Висушений ліофілізацією порошок наночастинок срібла переміщують у барабанний млин (БМ-16), подрібнення триває 20 хвилин до однорідного вигляду.

Контроль: Технологічний (час, візуальний огляд для оцінки ефективності деагломерації та подрібнення).

ТП 8. Просіювання

ТП 8.1. Просіювання

Подрібнений порошок наночастинок срібла подають у повітряне струминне сито з діаметром комірок 20 мкм (ПС-17) для контролю якості та видалення будь-яких залишкових великих агрегатів або сторонніх частинок. Час просіювання складає 20 хв.

Контроль: Технологічний (розподіл частинок за розміром та візуальний огляд просіяного продукту).

ТП 9. Пакування та зберігання

ТП 9.1. Пакування та зберігання.

Очищений, подрібнений та просіяний порошок наночастинок срібла фасують у великі темні флакони, які забезпечують надійний захист від вологи та світла. Це є критично вадливим для збереження стабільності наночастинок срібла та запобігання їхній деградації або агрегації.

Контроль: Хімічний (стабільність продукту (розмір частинок, агрегація), протягом терміну зберігання за допомогою УФ спектрофотометрії та DLS).

РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КРЕМУ

6.1. Обґрунтування обрання форми та упаковки

Продуктом, що розглядається, є дерматологічний крем, призначений для догляду за проблемною шкірою, що містить два критично важливі активні компоненти: фенетиловий ефір кавової кислоти (CAPE) та наночастинки срібла (AgNPs).

Як первинну упаковку для крему з наночастинками срібла та фенетиловим ефіром кавової кислоти доцільно обрати алюмінієву тубу. Оскільки алюмінієві туби забезпечують максимальний бар'єр проти проникнення кисню, вологи, світла, що критично для кремів з чутливими, активними компонентами. Алюміній утворює непрозору, непроникну для газів та водяної пари оболонку, яка блокує ультрафіолетове випромінювання та видиме світло, тим самим запобігаючи фотодеструкції активних молекул у кремі, як наночастинки срібла.

При заповненні та герметичному закупорюванні туби утворюється інертне середовище, позбавлене повітря — це нейтралізує ризик окиснювальних реакцій, з якими креми, що містять органічні кислотні ефіри або наночастинки металів, часто надчутливі. Такий захист надзвичайно важливий для збереження стабільності фенетилового ефіру кавової кислоти та для недопущення агрегації чи інактивації наночастинок срібла.

Внутрішня поверхня алюмінієвої туби, як правило, покривається спеціальним нейтральним лаком або полімерним внутрішнім покриттям, яке запобігає хімічній взаємодії між металом і формулою крему (наприклад, із кислотами, ефірами, жирними компонентами). Це забезпечує хімічну інертність упаковки щодо активних інгредієнтів, запобігаючи корозії металу, змінам запаху чи смаку (Baykasoğlu, Baykasoğlu та Cetin, 2024).

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Васильєва О.Л.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.				53	127
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КРЕМУ		

Окрім функціональної ефективності, алюмінієві туби — це легкий, механічно стійкий і технологічний матеріал. Вони витримують механічні навантаження, транспортування, температурні коливання, не ламаються, не тріскаються, що важливо при серійному виробництві та реалізації.

Вторинним пакуванням обрано картону пачку, що захищатиме тубу від деформації та забезпечуватиме необхідний захист від механічних пошкоджень, тим самим підтримуючи функціональну цілісність критично важливого первинного пакування.

6.2. Обґрунтування технологічних особливостей отримання крему

6.2.1 Технологія отримання фенетилового ефіру кавової кислоти за допомогою рекомбінантної іммобілізованої ліпази (Lip7)

Реакція етерифікації кавової кислоти для отримання CAPE каталізується рекомбінантною іммобілізованою ліпазою Lip7. Вибір іммобілізованого ферменту, є технологічно обґрунтованим, оскільки іммобілізація значно спрощує подальше виділення каталізатора, підвищує його термічну та оперативну стабільність, а головне дозволяє його повторне використання, що критично знижує витрати на біокаталіз у промислових масштабах.

Для досягнення високої конверсії кавової кислоти в CAPE (що може сягати понад 91%), необхідно забезпечити специфічні умови. Пряма етерифікація вимагає використання значного надлишку спиртового субстрату (2-фенілетанолу) для зміщення рівноваги реакції у бік продукту. В нашому випадку вихід ефіру становить 76,5%, згідно з наведеними раніше даними.

Реакція проводиться при підвищених температурах (60°C) протягом 24 годин, що є типовим для ферментативного синтезу.

Синтез CAPE проводиться у реакторі, обладнаному сорочкою та мішалкою для забезпечення рівномірного контакту субстратів з іммобілізованим ферментом.

Після завершення реакції, необхідне виділення та очищення CAPE. Першим кроком є центрифугування для відділення іммобілізованої ліпази Lip7. Це забезпечує рециркуляцію ферменту. Оскільки реакція проводиться з великим

надлишком 2-фенілетанолу наступною стадією є вакуумне випарювання. Це дозволяє ефективно видалити залишки розчинника та концентрувати ефір.

6.2.2 Обґрунтування використання допоміжних речовин у кремі для проблемної шкіри

Таблиця 6.1

Перелік допоміжних речовин та їх функцій у кремі для проблемної шкіри

Найменування компонентів	Функціональне значення	Функціональна роль	Технологія введення	Фізико-хімічні властивості
<i>Пропіленгліколь</i>	Антимікробний консервант, дезінфікуючий засіб, зволожувач, пластифікатор, гідрофільний розчинник	Зволожувач для основних компонентів та запорука їх рівномірного розподілу по усій поверхні крему	Суспендування основних компонентів в пропіленгліколі	Безбарвна, майже без запаху, прозора, в'язка рідина; замерзає при температурі -60°C
<i>Парафін рідкий</i>	Компонент основи, гідрофобний розчинник	Відповідає за зменшення ефекту оклюзії; дисперсна фаза кремової основи	Змішування парафіна рідкого з іншими компонентами	Безбарвна, без запаху, прозора, в'язка рідина; замерзає при температурі не вище -5°C
<i>Ізопропілмірістат</i>	Розчинник	Виступає в якості пом'якшувача (емолента); знижує відчуття жирності шкіри	Змішування ізопропілмірістата з іншими компонентами	Прозора, безбарвна, майже без запаху рідина з незначною в'язкістю; застигає при температурі 5°C
<i>Цетостеариловий спирт</i>	Емульгатор, регулятор в'язкості	Виступає в якості емульгатора для води та регулятора в'язкості для крему	Змішування цетостеарилового спирту з іншими компонентами	Білі або майже білі пластівці; при нагріванні плавляться і стають прозорими; температура плавлення 50°C
<i>Цетомакрогол 1000</i>	ПАР, пластифікатор, розчинник	Емульгатор для води з високим гідрофільно-ліпофільним числом	Змішування цетомакрогола з іншими компонентами	Біла або майже біла, тверда воскоподібна або парафіноподібна речовина; температура плавлення 35-40°C

Закінчення таблиці 6.1

<i>Імідосечовина</i>	Антимікробний консервант	Антимікробний консервант	Розчинення у воді очищеній та додавання при обмежених температурних параметрах	Білий, розсіпчастий, гігроскопічний порошок без запаху; водорозчинний
<i>Динатрію гідрофосфат додекагідрат</i>	Регулятор рН, емульгатор	Регулятор рН основи	Розчинення у водній фазі разом з лимонною кислотою	Безбарвні або прозорі кристали; водорозчинні
<i>Кислота лимонна моногідрат</i>	Регулятор рН, антиоксидант	Регулятор рН суспензії	Розчинення у водній фазі разом з натрієм гідрофосфат додекаінатом	Кристалічна речовина без кольору та запаху; водорозчинна
<i>Вода очищена</i>	Розчинник, дисперсне середовище кремової основи	Дисперсне середовище кремової основи	Формування водної фази; внесення в основу крему у вигляді розчину водорозчинних компонентів	-

**6.3 Матеріальний розрахунок та орієнтовні норми витрат на серію
виробництва крему**

Таблиця 6.2

Компоненти			Норма витрат		Витрати		Джерело*
Найменування	Одиниці виміру	Орієнтовна вартість, грн/шт грн/кг**	г на 1 тубу (30 г крему)	г на серію (16 632 туби)	на 1 тубу (30 г крему), грн	на серію (16 632 туби), грн	
Сировина							
Фенетиловий ефір кавової кислоти	кг	Зроблено на виробництві	0,015	249,48	-	-	-
Наночастинки срібла	кг	Зроблено на виробництві	0,01 мг	166,32 мг	-	-	-
Пропіленгліколь	кг	250	0,225	3 742,2	0,056	931	1
Парафін рідкий	л	276	0,3	498 960	0,083	1 377	2
Ізопропілмірістат	кг	45	12	199 584	0,54	8 981	3
Цетостеариловий спирт	кг	255	1,5	24 948	0,38	6 361	4
Цетомакрогол 1000	кг	1 012	1,575	26 195,4	1,59	26 509	5
Імідосечовина	кг	232	0,06	997,92	0,014	232	6
Динатрію гідрофосфат додекагідрат	кг	620	0,045	748,44	0,03	464	7
Кислота лимонна моногідрат	кг	48	0,015	249,48	0,00072	12	8
Очищена вода	мл	Зроблено на виробництві	До 100%	До 100%	-	-	-
Всього	-	-	12	498 9782	2,69	44 867	-
Пакувальні та допоміжні матеріали							
Туба алюмінієва	шт.	Під замовлення	1	16 632	-	-	-
Пачка картонна	шт.	Під замовлення	1	16 632	-	-	-
Етикетка групова	шт.	2	-	550 (на кожну коробку)	-	1 100	9
Короб груповий	шт.	45	-	550 (по 30 туб у коробці)	-	34 750	10

* 1- <https://prom.ua/p663848121-propilenglikol-999.html>; 2- <https://selitra.biz/uk/p616278500-paraphin-ridkij-bp-dab-nf-ph-eur-107174-2500-merck-2-5-1.html?srsId=AfmBOopHRxjaeIH-53A0FYnbyGfIbkmjM-q0UJJwas2dFGglRrZOVIBT>; 3- <https://soda.kiev.ua/ua/p608461374-izopropilmiristat-basf.html>; 4- https://prom.ua/p2099835097-tsetilstearilovyj-spirt-5050.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_819_pischevye_dobavki_121207376&gad_source=1&gad_campaignid=22873340326&gclid=Cj0KCQiA0KrJBhCOARIsAGIy9wB97-C6ohvPXblz7k7AxHqJWe_MfMQsOILfY9LTzdXpWxWQqeFzh74aAivBEALw_wcB; 5- <https://uhtrade.com.ua/napolniteli/1966/?srsId=AfmBOoqMAw3at7EN6LOX-2fUAblukypc8CV9paTV6i3wGiLtLR5yBroz>; 6- <https://www.alibaba.com/suppliersubdomainalibabacom/product-detail/China-Factory-99-Imidazolidinyl-Urea-Imidurea-1600332526333.html?spm=a2700.7724857.0.0.ffab7510gqonFs>; 7- <https://shop.hlr.ua/ua/dinatriy-gidrofosfat-dodekagidrat-ech-dab-r-eur-bp-25-kg-237537.html>; 8- <https://kaapri.com.ua/ua/p817950619-limonnaya-kislota-pischevaya.html>; 9- <https://multilabel.uaprom.net/ua/g9287919-etiketka-zakaz-obraztsy>; 10- https://profipak.com.ua/ua/p746589574-kartonnaya-korobka-650.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=19176086328&gclid=Cj0KCQiA0KrJBhCOARIsAGIy9wCz3k8UGIRy8YhGiovNYkstr5S06HQW9PiMKY7cRAUjQY7APuPZ48AaAspiEALw_wcB

** Вартість наведено станом на 25.11.2025

6.4 Специфікація обладнання

Таблиця 6.3

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)	Посилання *
P-1 P-6 P-9	Реактор	3	Реактор змішувач 40000 л. (Завод технологічного обладнання). Під замовлення. Оснащений мішалкою та теплоізолюючою сорочкою, датчиками: рН, O ₂ , рівню рідини та температури.	1
H-2 H-4 H-7 H-10 H-12	Насос відцентровий	5	Насос відцентровий «Leo». Продуктивність 500 л/хв, Потужність 1,5 кВт, 371×206×263	2
Ц-3	Центрифуга	1	Декантерна центрифуга (Fenix Process Technologies Private Limited) Нержавіюча сталь, Продуктивність 10 м ³ /год, Габарити: 2800×1500×1000 мм	3
ВВУ-5	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум випарна установка «Wenzhou Suote Pharmaceutical And Chemical Engineering Co., Ltd.». На замовлення.	4
Ф-8	Фільтр	1	Нержавіючий сталевий фільтр «Ayvaz YS-800 DN 50».	5
ВЗГ-11	Вакуумний змішувач гомогенізатор	1	Вакуумний змішувач гомогенізатор «Zhejiang Hengdong Stainless Steel Co., Ltd.». На замовлення. Діапазон швидкості 1-3000 об.	6

ТМ-13	Тубонаповнювальна машина	1	Тубонаповнювальна машина «АХО 2800». 28 станцій. Діапазон дозування 3-250 (500 опційно). Продуктивність: 250 шт/хв.	7
ГФ-14 ГФ-15	Стіл для пакування	2	Стіл виробничий. Каркас металічний, фарбування порошкове, столешня – посформінг. Габаритні розміри, мм: 1200×800×760.	8
ГФ-16	Пакувальна машина	1	Пакувальна машина «Vektor FM5540». Призначена для пакування картонних коробок у термоусадкову плівку. Габаритні розміри, мм: 650×1100×400. Фактична продуктивність, пачок за годину: 500 до 800/год.	9

* 1- <https://prom.ua/ua/p133617469-reactor-smesitel.html>; 2- https://rozetka.com.ua/ua/leo_775279/p2230202/; 3- <https://www.indiamart.com/proddetail/decanter-centrifuge-25239820797.html?srsId=AfmBOoo7J7o4naX8lyZY-vNmmGb0-ry2nQTKc5VEaWJ6UbB4BS4Hm5hO>; 6- <https://www.pulsemaster.us/pef-machinery>; 4- https://www.alibaba.com/product-detail/High-Efficient-Stainless-Steel-Vacuum-Evaporating_1601144365229.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.461213a0pEPYIU&priceId=df24eeb78e314bc38c6f0775a255ea92; 5- <https://armashop.ua/filtr-setchatyy-nerzhaveushchiy-ayvaz-ys-800-du-50/>; 6- https://www.alibaba.com/product-detail/3000L-Stirred-Homogenizer-Reactor-Double-Jacketed_1601268928009.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.5.3a7013a0upYeUY&priceId=ad0debfa8a7426f8ff7ae49a99dfd14; 7- <https://prom.ua/p266098174-tubonapolnitelnaya-mashina-axo.html>; 8- https://prom.ua/p2026387774-stol-proizvodstvennyj-polkoj.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5_297199152&gad_source=1&gad_campaignid=20983226771&gclid=CjwKCAiA86_JBhAIEiwA4i9Ju0p67A6JxEaqiyrbNEzTJFrLTZPE0Lmk_412tLsHh4TnRR83GTRrCRoCRw8QAvD_BwE; 9- https://industrial-kitchen.com.ua/uglovaya-termosadochnaya-upakovochnaya-mashina-s-kryshkoj-termosadka-vektor-fm5540?gad_source=1&gad_campaignid=23106373874&gclid=CjwKCAiA86_JBhAIEiwA4i9Ju6tY91Bwxm6e6o8jPqY3tw_Dnw5OuL07jL5rZrJVueI0rOhRSDyyBoC92EQAvD_BwE.

6.5 Опис технологічної схеми отримання крему для проблемної шкіри

ДР 1. Естерифікація кавової кислоти

ДР 1.1 Естерифікація кавової кислоти

У реактор Р-1 додаються 30004 л 2-фенілетанола та 326 129 мг кавової кислоти. Також додають 1,63 кг іммобілізованої ліпази в якості каталізатора. Реакцію проводять при 60°C, 200об/хв протягом 24 годин.

Контроль: Технологічний (температура, час, швидкість перемішування).

ДР 2. Центрифугування

ДР 2.1 Відокремлення іммобілізованої ліпази

Після реакції, розчин переходить за допомогою насоса Н-2 у центрифугу Ц-3 для відокремлення іммобілізованої ліпази. Центрифугування відбувається при 5000 об/хв 20 хв.

Контроль: Технологічний (швидкість, час центрифугування).

ДР 3. Концентрування ефіру

ДР 3.1 Вакуумне випарювання

Отриманий розчин насосом Н-4 у вакуум-випарну установку (ВВУ-5) для вилучення надлишку 2-фенілетанолу та отримання концентрованого розчину ефіру. Сушіння відбувається 7 годин при 40°C, P=0,3 атм.

Контроль: Технологічний (температура, час, тиск).

ДР 4. Приготування основи крему

ДР 4.1 Приготування основи крему

У реактор Р-6 завантажують цетостеариловий спирт та цетомакрогол 1000, підвищують температуру до 70°C та розплавляють. Додати рідкий парафін та ізопропілмірикат. Підтримувати температуру від 60 до 70°C. Додати очищену воду у реактор та встановити температуру 70°C. Розчинені у очищеній воді динатрій гідрофосфат додекагідрат, лимонна кислота та імідосечовину додаються у розчин. Суміш переноситься насосом (Н-7) у вакуумний змішувач гомогенізатор (ВЗГ-11) пропускаючись через нержавіючий сталевий фільтр (Ф-8).

Контроль: Технологічний (температура, час, тиск, порядок додавання компонентів).

ДР 5. Підготовка основних компонентів

ДР 5.1 Підготовка основних компонентів

У реактор (Р-9) додають пропіленгліколь та в нього суспензують наночастинки срібла та фенетиловий ефір кавової кислоти. При температурі 40-45°C, 200 об/хв. Суспензія переноситься за допомогою насоса (Н-10) у вакуумний змішувач гомогенізатор (ВЗГ-10) при перемішуванні вже наявних там компонентів.

Контроль: Технологічний (температура, швидкість перемішування).

ТП 6. Гомогенізація крему

ТП 6.1 Гомогенізація крему

Підготовлені компоненти крему з ДР 4.1 гомогенізується у вакуумному змішувачі гомогенізаторі (ВЗГ-11) при $P=0,5\text{бар}$. 10 хв. Суміш охолоджується до $40-45^{\circ}\text{C}$. Суміш з ДР 5.1 переносяться у вакуумний змішувач гомогенізатор (ВЗГ-11) та гомогенізуються також при $P=0,5\text{бар}$. 10 хв.

Контроль: Технологічний (температура, час, тиск).

ТП 7. Охолодження крему

ТП 7.1 Охолодження крему

Кінцева суміш крему охолоджується до $25-30^{\circ}\text{C}$ при постійному перемішуванні 200об/хв.

Контроль: Технологічний (температура, час, швидкість перемішування), Хімічний (однорідність, кількісний вміст основних компонентів, супутні домішки, pH), Мікробіологічний (ТАМС, ТУМС, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa).

ПМВ 8. Фасування, маркування та пакування

ПМВ 8.1 Фасування крему у туби

Завдяки насосу (Н-12) крем поступає до тубонаповнювальної машини (ТМ-13). Де проходить автоматичне наповнення туб по 30 г крему.

Контроль: Технологічний (маса вмісту упаковки).

ПМВ 8.2 Укладання туб у картонні пачки

На столі для укладання (ГФ-14) туби вручну складають у індивідуальні картонні пачки та маркують.

Контроль: Технологічний (правильність маркування).

ПМВ 8.3 Складання групових коробів

На столі для укладання (ГФ-15) картонні пачки з кремом складають у груповий короб з картону коробкового для споживчої тари за ГОСТ 7933-89. Коробку закривають кришкою та обклеюють груповою етикеткою-бандероллю.

Контроль: Технологічний (кількість пачок у коробі).

ПМВ 8.4 Упаковка у термоусадочну плівку

Надалі коробки з готовою продукцією упаковують у плівку термоусадочну на машині «Mini shell» (ГФ-16).

Відбраковану друковану продукцію та її залишки передають на утилізацію у відповідності з СРП-А-П-№3 «Порядок передачі друкованої продукції на утилізацію».

Готова продукція надходить до карантинного складу де зберігається до одержання результатів аналізу на відповідність вимогам АНД. Після отримання позитивних результатів від ВКЯ та отримання сертифікату якості – готова продукція передається на склад готової продукції.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1 Методи контролю виробництва ліпази Lip7 та наночастинок срібла

Розробка інноваційного косметичного засобу, спрямованого на боротьбу із запальними процесами на шкірі, базується на використанні фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE) та біогенних наночастинок срібла (AgNPs), отриманих за допомогою *Geobacillus thermodenitrificans* Az1, як ключових активних компонентів. Ефективність отримання CAPE в наслідок реакції естерифікації званою мірою залежить від якості ліпази (Lip7), що експресується штамом *Escherichia coli* C41 (DE3) з використанням генів *Geobacillus* sp. ID17. Для забезпечення високої якості, безпеки та стабільності цих компонентів на всіх етапах виробництва, впроваджено методи контролю якості, такі як оцінка ферментативної активності ліпази та комплексні методи характеристики наночастинок срібла.

7.1.1 Контроль активності ліпази

Спектрофотометричний метод з використанням р-нітрофеніл лаурату (pNPL)

Цей рутинний спектрофотометричний метод дозволяє вимірювати активність ліпази шляхом моніторингу появи р-нітрофенолу (pNP), що вивільняється в результаті гідролізу хромогенного субстрату р-нітрофеніл лаурату (pNPL, C12). Метод є високопродуктивним, оскільки адаптований для використання у 96-лункових мікропланшетах, що забезпечує швидкий скринінг великої кількості зразків (Salas-Bruggink, Guzman, Espina & Blamey 2024; Palacios, , Busto, & Ortega, 2014). Отримана ліпаза Lip7 має характеризувати активністю: 790 ± 120 у екстракті, 1800 ± 250 після термічної денатурації.

Підготовка реагентів та субстрату:

Субстрат: р-нітрофеніл лаурат (pNPL, C12) (наприклад, від Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Готують 3.0 мМ розчин pNPL, розчинений в ацетонітрилі.

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Васильєва О.Л.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.Л.					85	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Буферний розчин: Використовують відповідний буферний розчин з додаванням 2% (об/об) Triton X-100. Вибір буфера та його рН повинен бути оптимізований для ліпази Lip7, враховуючи її термофільну природу та потенційно оптимальний рН.

Стандарт рNP: Для побудови калібрувальних кривих використовують 10 мМ стандарт р- нітрофенолу (рNP) (наприклад, від Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Готують зростаючі концентрації рNP: 5, 25, 50, 100 та 200 мкМ.

Процедура вимірювання:

1. Реакцію проводять у 96-лункових мікропланшетах з пласким дном (наприклад, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2. У кожен лунку додають 175 мкл буферного розчину з 2% (об/об) Triton X-100.

3. Додають 5 мкл зразка ліпази.

4. Реакційну суміш попередньо інкубують протягом 5 хвилин. Для ліпази Lip7, отриманої з *Geobacillus* sp. ID17, необхідно експериментально визначити оптимальну температуру, яка, ймовірно, буде вищою за стандартні 37°C, оскільки *Geobacillus* spp. є термофілами з оптимальними температурами росту 45-75 °C.

5. Реакцію ініціюють додаванням 3.0 мМ розчину рNPL.

6. Усі вимірювання проводять у трьох повторах.

7. Хід реакції контролюють шляхом вимірювання зміни абсорбції при 405 нм з часом за допомогою мікропланшетного спектрофотометра (наприклад, Bio Tek Epoch2 microplate spectrophotometer, Bio Tek, Winooski, VT, USA).

8. Додатково, зміну абсорбції також вимірюють при 347 нм, оскільки абсорбція рNP на цій довжині хвилі не залежить від рН.

Кількісне визначення та розрахунок одиниць активності:

1. Концентрацію утвореного рNP визначають за допомогою попередньо побудованих калібрувальних кривих, використовуючи стандарт рNP. Для цього вимірюють абсорбцію стандартних розчинів рNP (5, 25, 50, 100 та 200 мкМ) при 405 нм та 347 нм.

2. Одна одиниця (U) активності ліпази визначається як кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль pNP за 1 хвилину за умов проведення аналізу (Gupta, Rathi, & Gupta, 2002).



Рис. 3 Мікропланшетний спектрофотометр (Bio Tek)

7.1.2 Контроль характеристик наночастинок срібла

Характеристика наночастинок срібла, біосинтезованих за допомогою *Geobacillus thermodenitrificans* Az1, є фундаментальною для підтвердження їх утворення, визначення фізичних властивостей (розмір, стабільність) та розуміння механізмів їх стабілізації.

Підтвердження біосинтезу спектрофотометричним аналізом (УФ-видима спектрофотометрія)

УФ-видимий спектральний аналіз є стандартним та надійним методом для підтвердження успішного біосинтезу наночастинок срібла (AgNPs) та їх наявності у зразках. Метод ґрунтується на явищі поверхневого плазмонного резонансу (далі – SPR), що є характерним для металевих наночастинок. SPR виникає внаслідок колективних коливань електронів провідності на поверхні металу, коли вони збуджуються світлом певної довжини хвилі, що призводить до сильного поглинання та розсіювання світла (Akhter та ін., 2024).

Процедура аналізу та використання спектрофотометра: Аналіз проводять за допомогою УФ-видимого спектрометра, такого як Varian CARY®50. Для початку, 3 мл дистильованої води або відповідного контрольного розчину (наприклад, бактеріального ростового середовища без AgNO₃) наливають у кювету та встановлюють як спектр контролю. Після калібрування, 3 мл зразка з AgNPs

вносять у кювету та встановлюють у спектрофотометр для вимірювання. Довжина хвиль для дослідження зазвичай встановлюється в діапазоні 200-800 нм, хоча можуть використовуватися інші діапазони, наприклад, 300-600 нм або 300-800 нм (Asif та ін, 2022).

Інтерпретація результатів: За наявності наночастинок срібла, на графіку спостерігається характерний пік поглинання в діапазоні 410-430 нм. Цей пік є прямим підтвердженням утворення AgNPs. Візуально біосинтез AgNPs часто супроводжується зміною кольору розчину від світло-коричневого/безбарвного до темно-коричневого або червонувато-коричневого, що вказує на утворення наночастинок. Ця кореляція між макроскопічним спостереженням та мікроскопічними оптичними властивостями наночастинок дозволяє використовувати візуальну зміну кольору як швидкий, якісний індикатор успішного біосинтезу на ранніх етапах процесу. Це робить УФ-видиму спектрофотометрію не тільки методом підтвердження, а й інструментом для швидкого скринінгу та моніторингу процесу. Пік SPR залежить від розміру, форми та локального показника заломлення наночастинок. Менші сферичні наночастинок поглинають світло і мають піки близько 400 нм, тоді як більші сфери демонструють збільшене розсіювання, а їх піки розширюються та зміщуються до довших хвиль (червоне зміщення). Агрегація наночастинок призводить до зміщення піку SPR до довших хвиль, зменшення інтенсивності оригінального піку та/або появи вторинного піку, що може бути використано для моніторингу стабільності розчинів (Akhter та ін., 2024).

Визначення розміру та дзета-потенціалу наночастинок срібла (DLS/PCS)

Для визначення гідродинамічного розміру та дзета-потенціалу наночастинок срібла використовується метод фотонної кореляції спектроскопії (PCS), також відомий як динамічне розсіювання світла (далі – DLS). DLS ґрунтується на вимірюванні часової шкали броунівського руху частинок у розчині. Лазерний промінь освітлює зразок, а коливання інтенсивності розсіяного світла аналізуються для визначення коефіцієнта трансляційної дифузії, який потім перетворюється на

гідродинамічний радіус за допомогою співвідношення Стокса-Ейнштейна. Дзета-потенціал, у свою чергу, вимірюється методом електрофоретичного розсіювання світла (ELS) і відображає поверхневий заряд частинок, що є ключовим показником їх колоїдної стабільності (Rahtar, Amini, Askari, & Susan, 2019).

Процедура вимірювання на наносайзері: Для аналізу використовують наносайзер (наприклад, DynaPro™ ZetaStar™). 1.5 мл зразка з наночастинками срібла вносять у кювету 10 мм. Під час дослідження підтримують постійну температуру, наприклад, 25°C. Вводять необхідні параметри розчинника, такі як показник заломлення (наприклад, 1.07 для AgNPs у певному середовищі, або 1.33 для води) та значення поглинання (наприклад, 0.01). Кут розсіювання світла здебільшого становить 173° або 90°. Вимірювання зазвичай займають менше хвилини (Chicea та ін., 2023).

Значення дзета-потенціалу для стабільності наночастинок: Величина дзета-потенціалу вказує на ступінь електростатичного відштовхування між частинками, що є критичним для стабільності колоїдної системи. Вищі абсолютні значення дзета-потенціалу (як позитивні, так і негативні) свідчать про кращу стабільність наночастинок та меншу схильність до агрегації. Загальні орієнтири стабільності за дзета-потенціалом включають: 0-5 мВ (тенденція до агрегації), 5-20 мВ (мінімальна стабільність), 20-40 мВ (помірна стабільність), 40+ мВ (висока стбільність). Для біосинтезованих AgNPs за допомогою *Geobacillus spp.* фіксуються значення дзета-потенціалу в діапазоні від -25.7 до -31.3 мВ, що вказує на помірну до високої стабільність. Важливим аспектом є взаємозв'язок між гідродинамічним розміром, визначеним DLS, та істинним розміром, визначеним трансмісійною електронною мікроскопією (далі – TEM). Гідродинамічний діаметр (DLS) включає будь-які агрегати, тоді як TEM вимірює істинний розмір частинки. Якщо гідродинамічний діаметр значно більший за розмір, визначений TEM, це є чітким індикатором агрегації наночастинок у розчині. Цей зв'язок дозволяє використовувати DLS як швидкий і неруйнівний метод моніторингу стабільності AgNPs у розчині. Якщо DLS показує значне збільшення розміру з часом або після певних маніпуляцій, це сигналізує про проблеми зі стабільністю, що вимагає подальшого розслідування

(наприклад, за допомогою TEM) та оптимізації умов зберігання або складу засобу (Rodriguez-Loya, Lerma, & Gardea-Torresdey, 2023; Rahdar, Amini, Askari, & Susan, 2019; Chicea та ін., 2023).

Визначення діаметру наночастинок срібла за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ)

Трансмісійна електронна мікроскопія (далі – ТЕМ) є золотим стандартом для прямого вимірювання розміру, форми, морфології та розподілу розмірів наночастинок. ТЕМ використовує пучок електронів, що проходять крізь зразок, забезпечуючи значно вищу роздільну здатність порівняно з світловою мікроскопією. Контраст зображення залежить від товщини зразка та матеріалу (Alduraihem та ін., 2023).

Підготовка тестового зразка: Відібраний зразок суспензії наночастинок центрифугують (наприклад, 10000-13000 об/хв) для концентрування наночастинок та видалення надлишкових домішок. Осад тричі промивають деіонізованою водою. Суспензію у деіонізованій воді використовують як зразок для аналізу. Зразки для аналізу розміщують на мідних сітках, суцільно покритих вуглецевою плівкою, шляхом нанесення однієї краплі суспензії. Сітки дозволяють повільно висихати на повітрі при кімнатній температурі. Неправильна підготовка зразка, така як швидке висихання або наявність домішок, може призвести до агрегації наночастинок на сітці, що спотворить реальний розподіл розмірів та морфологію. Для отримання репрезентативних даних ТЕМ, які відображають стан наночастинок у розчині, необхідно суворо дотримуватися протоколу підготовки зразків, мінімізуючи артефакти агрегації (Baran та ін., 2022; Alduraihem та ін., 2023).

Аналіз розчину та розподілу частинок: Аналіз проводять за допомогою ТЕМ-пристрою (наприклад, Philips/FEI CM 200 при 120 кВ або JEOL 2010 при 160 кВ). Для високої роздільної здатності може бути використаний Теснаї G2 F30 при 300 кВ. На мікрофотографіях ТЕМ наночастинок срібла зазвичай виглядають сферичними та добре диспергованими. Середні діаметри частинок та їх розподіл розраховуються щонайменше з 30 частинок з кожної мікрофотографії ТЕМ. Для

більш точного визначення розподілу розмірів, оцифровані зображення можуть бути оброблені за допомогою програмного забезпечення. Розмір біосинтезованих AgNPs має бути в діапазоні 1,44-16,3 нм (Baran та ін., 2022; Alduraihем та ін., 2023).

Виявлення функціональних груп для утворення та стабілізації наночастинок срібла за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR)

FTIR спектроскопія базується на вібрації та обертанні атомів у молекулах. Молекули поглинають інфрачервоне світло на певних частотах, що відповідають коливальним модам їх хімічних зв'язків. Отриманий спектр поглинання є «молекулярним відбитком», що дозволяє ідентифікувати та характеризувати різні органічні та неорганічні речовини (Khan, Haider, Hossain, & Rasel, 2023).

Роль у виявленні біомолекул: FTIR є провідним методом у зеленому синтезі наночастинок, оскільки він дозволяє ідентифікувати функціональні групи біомолекул (наприклад, білків, полісахаридів) у бактеріальному екстракті, які відповідають за відновлення іонів металу та стабілізацію утворених наночастинок. Важливо зазначити, що самі металеві наночастинок не мають інфрачервоних абсорбційних властивостей, тому FTIR аналізує адсорбовані на них біомолекули (Sharifi-Rad, Pohl, & Epifano, 2021).

Процедура аналізу: Відібрані зразки (наприклад, супернатант *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 та суспензія AgNPs) аналізують за допомогою FTIR спектрометра (наприклад, Thermal science-Nikolet Si5). Вимірювання проводять у діапазоні довжин хвиль, наприклад, 600-4000 см або 400-4000 см, з роздільною здатністю 0.4-4 см. Отримані піки порівнюють зі стандартними діаграмами функціональних груп (Khan, Haider, Hossain, & Rasel, 2023; Sharifi-Rad, Pohl, & Epifano, 2021).

Інтерпретація спектрів: Порівняння спектра чистого екстракту з спектром синтезованих AgNPs дозволяє виявити зміни (зникнення, зменшення інтенсивності або зміщення піків), що вказує на залучення певних функціональних груп у процес відновлення. Незмінні піки можуть вказувати на функціональні групи,

відповідальні за стабілізацію. Типові функціональні групи, що можуть бути виявлені, включають:

- Гідроксильні групи (O-H): Піки близько 3300-3400 см (наприклад, 3417 см, 3307 см). Вказують на присутність спиртів, фенолів, карбонових кислот, які можуть діяти як відновники та стабілізатори.
- Амідні групи: Піки близько 1600-2650 см та 1500-1570 см. Вказують на присутність білків, які є основними стабілізаторами агентами для наночастинок (Khan, Haider, Hossain, & Rasel, 2023; Sharifi-Rad, Pohl, & Epifano, 2021).

7.2 Контроль якості крему для проблемної шкіри

Таблиця 7.1

Критичні показники якості продукту та методи їх контролю

Найменування показника контролю	Допустимі межі	Метод контролю
<i>Зовнішній вигляд пакування</i>	Туба крему без значних механічних пошкоджень	Відповідно специфікації виробу <i>Візуально</i>
<i>Опис продукту</i>	Крем білого або майже білого кольору	Відповідно АНД <i>Візуально</i>
<i>Однорідність</i>	Відсутність видимих частинок, сторонніх включень, агрегації, коагуляції частинок	Відповідно АНД та специфікації виробу <i>Візуально</i>
<i>Маса вмісту упаковки</i>	Не менше 30 г	Відповідно специфікації виробу <i>Зважування</i>
<i>Кількісне визначення</i>	0,015 г CAPЕ / 1 туба	Відповідно АНД та специфікації виробу ДФУ ЄФ 2.2.29 <i>Високоєфективна рідинна хроматографія</i>
	0,01 мг AgNPs / 1 туба	Відповідно АНД та специфікації виробу <i>УФ-видима спектрофотометрія з подальшим розрахунком за законом Бугера-Ламберта-Бера ($A = \epsilon * l * C$),</i>

		<p>де A – кількість світла поглинута зразком, ε – молярний коеф.поглинання, l – товщина шару розчину, C – концентрація наночастинок срібла</p>
Супутні домішки	Загальна сума всіх домішок (за піками) не перевищує 1%	Відповідно АНД та специфікації виробу ДФУ ЄФ 2.2.29 Високоєфективна рідинна хроматографія
pH	Від 4,5 до 6,5	Відповідно АНД та специфікації виробу ДФУ ЄФ 2.2.3 Вимірювання pH
Мікробіологічна чистота	<p>Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – 10^3 КУО/1г Загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) - 10^1 КУО/ 1 г Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1г. Відсутність в 1 г.</p>	Відповідно АНД та специфікації виробу ДФУ ЄФ 2.6.12, 2.3.13 Визначення загального числа мікроорганізмів методом глибинного посіву. Випробування на окремі види мікроорганізмів за допомогою висіву на манітно-сольовий агар та цетримідний агар.
Система пакування	По 1 алюмінієвій тубі в індивідуальній картонній пачці. По 30 туб в груповому коробі	Відповідно специфікації виробу Оглядово

РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

8.1. Проект заявки на корисну модель. Спосіб отримання фенетилового ефіру кавової кислоти

8.1.1 Опис корисної моделі

Винахід належить до галузі біотехнології, зокрема до процесів ферментативного синтезу. Точніше він стосується виробництва ефірів, а саме синтезу фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE). CAPE є природним похідним кавової кислоти, що володіє значними фармакологічними властивостями. Доведено, що ця сполука має антиоксидантні, протизапальні, протиракові, противірусні, антибактеріальні та протигрибкові властивості. Даний ефір має використання у косметологічній, фармацевтичній промисловості як активний компонент мазей для загоєння ран, зменшення опіків та подразнень.

Запропонований спосіб передбачає ферментативну естерифікацію кавової кислоти з 2-фенілетанолом для отримання фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE).

Вибір ферменту: Як біокатализатор використовується рекомбінантна ліпаза (Lip7) на основі генів *Geobacillus* sp. ID17, що була експресована у рекомбінантній у *Escherichia coli* C41 (DE3). Цей фермент обраний завдяки його високій термостабільності (до 60°C при pH 8.0 та 50°C при pH 11.0) та винятковій стабільності в органічних розчинниках, включаючи потенційну активацію. Здатність ліпази (Lip7) зберігати свою нативну структуру в неполярних розчинниках навіть при високих температурах є критичною перевагою, що відрізняє її від багатьох інших ферментів, які денатуруються в таких умовах.

Реагенти: Кавова кислота (CA) та 2-фенілетанол (PE).

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Васильєва О.Л.</i>			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Скороцька О.Л.</i>				94	127
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>					
РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ							

Реакційне середовище: Реакція може проводитися в різних органічних розчинниках. Враховуючи успіх попередніх досліджень та властивості ферменту, перевага надається неполярним органічним розчинникам, таким як ізооктан.

Умови реакції (адаптовані та оптимізовані на основі властивостей ферменту та попередніх даних):

Температура: Реакція проводиться при підвищеній температурі, бажано в діапазоні від 50°C до 70°C. Імобілізована ліпаза Lip7 демонструє максимальну активність при 50°C і зберігає стабільність до 60°C. Це дозволяє досягти ефективної кінетики реакції, забезпечуючи при цьому стабільність ферменту та можливість повторного використання.

Молярне співвідношення: Молярне співвідношення кавової кислоти до 2-фенілетанолу може варіюватися для оптимізації виходу. На основі попередніх даних, можуть бути досліджені співвідношення, такі як 1:5, 1:10 або більший надлишок 2-фенілетанолу (наприклад, 1:92). Оптимальне співвідношення, наприклад 1:5, може забезпечити задовільну однорідність та вихід.

Завантаження ферменту: Кількість використовуваної ліпази буде оптимізована для досягнення максимальної ефективності конверсії.

Тривалість реакції: Тривалість реакції може бути оптимізована, зазвичай вона становить від 24 до 72 годин, з моніторингом стабільності.

Поєднання унікальної стабільності ліпази Lip7 з умовами, що забезпечують високі виходи, ідентифікованими у попередніх дослідженнях, створює синергетичну перевагу. Це означає, що ліпаза Lip7 потенційно може досягти ще вищих виходів або функціонувати більш надійно порівняно з іншими ліпазами в аналогічних або більш складних умовах. Це призводить до більш економічно життєздатного та масштабованого процесу, оскільки фермент зберігає свою активність та структуру навіть у середовищах, які зазвичай є несприятливими для інших біокатализаторів.

Етапи процесу:

1. Приготування реакційної суміші, що містить кавову кислоту, 2-фенілетанол, обраний органічний розчинник та рекомбінантну ліпазу Lip7;

2. Інкубація суміші при оптимізованій температурі з безперервним перемішуванням;
3. Моніторинг прогресу реакції (наприклад, за допомогою ВЕРХ) для визначення виходу та чистоти CAPE;
4. Відокремлення ферменту від реакційної суміші (наприклад, фільтрацією або центрифугуванням, оскільки фермент іммобілізований);
5. Очищення сирого продукту CAPE за допомогою стандартних методів хімічного розділення (наприклад, кристалізації, хроматографії) для досягнення бажаної чистоти.

8.1.2 Реферат до деклараційного патенту

Винахід стосується способу одержання фенетилового ефіру кавової кислоти (CAPE) шляхом ферментативної естерифікації кавової кислоти з 2-фенілетанолом. Відмінною особливістю способу є використання рекомбінантної ліпази, отриманої за допомоги генів *Geobacillus* sp. ID17, як каталізатора. Ця специфічна ліпаза є надзвичайно вигідною завдяки її винятковій термостабільності та стабільності в органічних розчинниках, що дозволяє ефективно проводити реакцію при підвищених температурах (наприклад, 50-60°C) та в органічних середовищах (наприклад, ізооктані). Ферментативний підхід забезпечує м'які умови реакції, усуває потребу в агресивних хімікатах та дає чистий продукт без побічних сполук. Метод пропонує вдосконалене, надійне та екологічно сприятливе рішення для промислового виробництва CAPE, сполуки, відомої своїми значними антиоксидантними, протизапальними та протираковими властивостями, що може використовуватися як активний компонент у косметологічній промисловості.

8.1.3 Формула корисної моделі

Спосіб одержання фенетилового ефіру кавової кислоти включає ферментативну естерифікацію кавової кислоти з 2-фенілетанолом. Як каталізатор реакції використовують рекомбінантну ліпазу на основі генів *Geobacillus* sp. ID17, яка здатна зберігати високу активність та стабільність при високих температурах та в присутності органічних розчинників (Salas-Bruggink, Guzmán, Espina, & Blamey,

2024). Реакцію проводять при температурі в діапазоні від 50°C до 60°C, в органічному розчиннику, переважно неполярному, такому як ізооктан. Молярне співвідношення кавової кислоти до 2-фенілетанолу становить від 1:5 до 1:92 (Olgierd, Kamila, Anna, & Emilia, 2021).

8.2 Проект заявки на корисну модель. Спосіб отримання біогенних наночастинок срібла

8.2.1 Опис корисної моделі

Винахід належить до галузі біотехнології, нанотехнології та дерматокосметології, зокрема до інноваційного способу біосинтезу та подальшої обробки наночастинок срібла (AgNPs) для їх застосування в медичних та косметичних препаратах, призначених для догляду за проблемною та запаленою шкірою. Наночастинки срібла, завдяки своїм потужним антимікробним, антибактеріальним та протигрибковим властивостям, є перспективним активним інгредієнтом у складі дерматокосметичних засобів. Їхня ефективність особливо актуальна у боротьбі з мікробними проліфераціями та біоплівками, які часто є причиною запальних станів шкіри, таких як акне, дерматити та інші інфекційні ураження. Застосування даної корисної моделі дозволить створити високоякісний, екологічно чистий та безпечний продукт, що поєднує терапевтичні властивості з вимогами сучасної космецевтики.

Пропонований спосіб одержання наночастинок срібла є повністю біотехнологічним і складається з декількох послідовних етапів:

1. Культивування мікроорганізму та отримання супернатанту.

Культивування термофільного штаму *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 відбувається в живильному середовищі з триптоном (10 г/л), дріжджовим екстрактом (5 г/л) та NaCl (10 г/л). Оптимальні умови культивування: температура 55°C, швидкість обертання 200 об/хв протягом 48 годин. Після завершення культивування рідину центрифугують для відділення біомаси, а безклітинний супернатант використовують для подальшого біосинтезу. Екзогенні ферменти та

білки, що секретуються клітинами, виконують роль відновників та стабілізаторів наночастинок.

2. Біосинтез наночастинок. До отриманого супернатанту додають 1 мМ AgNO_3 та проводять інкубацію за умов: температура 55°C , швидкість обертання 200 об/хв, тривалість 48 годин та без доступу світла. В результаті реакції біоредукції іонів срібла утворюються сферичні срібні наночастинок розміром 1,4-16,3 нм, які мають виражену антимікробну та протигрибкову активність.

3. Виділення наночастинок. Після виробничого біосинтезу для ефективного відокремлення наночастинок від залишків середовища (іонів Ag^+ , білків, ферментів тощо) проводять центрифугування та ультрацентрифугування. Ці методи вважаються недорогими, простими та ефективними для осадження наночастинок з колоїдного розчину, що дозволяє отримати концентрований розчин, придатний для подальшої обробки. Центрифугування має значні переваги над традиційною фільтрацією, оскільки дозволяє відокремлювати навіть дрібні наночастинок діаметром менше 2 нм, які можуть проходити крізь фільтраційні мембрани. Крім того, воно запобігає втратам продукту та забиванню мембран, що часто трапляється при фільтрації біогенних розчинів.

4. Сушіння наночастинок. Для переведення наночастинок у сухий стан з метою довгострокового зберігання та подальшої інтеграції в косметичні формули застосовується сублімаційна сушка (ліофілізація). Цей метод є найоптимальнішим, оскільки він є щадним до структури наночастинок, зберігаючи їхню морфологію та розподіл розмірів. Ліофілізація мінімізує утворення агрегатів та капілярних навантажень, які виникають при інших методах сушіння (наприклад, ротаційному випарюванні чи сушінні у вакуумі), що вимагають підвищених температур. Сублімаційна сушка значно покращує довготривалу стабільність колоїдних наночастинок і є визнаним методом у фармацевтичній промисловості.

5. Механічна обробка. Отриманий сухий порошок наночастинок срібла додатково піддається механічній обробці для деагломерації. Наступним етапом є просіювання за допомогою повітряного струминного сита, що використовує

поєднання тиску та вакууму для відокремлення будь-яких більших агломератів, забезпечуючи однорідний розмір частинок у кінцевому продукті.

8.2.2 Реферат до деклараційного патенту

Запропонована корисна модель стосується способу біосинтезу наночастинок срібла (AgNPs) з використанням безклітинного супернатанту мікроорганізму *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1 та 1 мМ AgNO₃. Отримані сферичні AgNPs мають розмір у діапазоні 1,4-16,3 нм, що забезпечує їх високу антимікробну та протигрибкову активність, а також є безпечним для використання у складі косметичних засобів.

Винахід передбачає послідовність етапів очищення, що підвищують якість та стабільність кінцевого продукту. Виділення наночастинок здійснюється за допомогою ультрацентрифугування, що дозволяє уникнути недоліків фільтрації. Для довгострокового зберігання та запобігання агрегації наночастинок висушуються методом сублімаційної сушки (ліофілізації). Даний спосіб дозволяє отримати високоякісні наночастинок срібла, що є ідеальним активним компонентом для розробки протизапального та антимікробного косметичного крему для проблемної шкіри.

8.2.3 Формула корисної моделі

Спосіб одержання наночастинок срібла біотехнологічним методом для використання в дерматокосметології, що відрізняється використанням безклітинного супернатанту термофільного мікроорганізму *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1 як відновлювача та стабілізатора іонів срібла, з наступними унікальними етапами:

- Виділення наночастинок з реакційного середовища методом ультрацентрифугування для забезпечення їхньої високої чистоти та повного осадження, включаючи частинки малих розмірів;
- Сушіння отриманих наночастинок методом сублімаційної сушки (ліофілізації) для збереження їхньої морфології та забезпечення довготривалої стабільності без агрегації;

- Фінальна механічна обробка, що включає подрібнення та просіювання у повітряному струминному ситі, для досягнення деагломерації та однорідного розподілу розмірів частинок у кінцевому порошковому продукті.

ВИСНОВКИ

Термофільні бактерії роду *Geobacillus*, враховуючи унікальну здатність адаптуватися, синтезувати широкий спектр біологічно активних сполук та обширність застосування синтезованих ними сполук у різних промислових процесах, є крайнє перспективними мікроорганізмами для сучасної біотехнології.

Однак всі можливості та перспективи даних бактерій не є повноцінно досліджені і потребують подальшого вивчення. Особливої уваги заслуговують покращення продуктивності штамів, розширення можливостей використання бактерій роду *Geobacillus* як донорів генів для рекомбінантної модифікації більш продуктивно спроможних мікроорганізмів, як наприклад *E. coli*.

Аналіз ринку косметичних засобів свідчить про високий попит на інноваційні та натуральні продукти для проблемної шкіри, попри значну конкуренцію в цьому сегменті. У відповідь на ці потреби робота пропонує сучасний біотехнологічний підхід із використанням термофільних бактерій роду *Geobacillus*. Це дозволило отримати високостабільні біокаталізатори (ліпазу Lip7) та наночастинки срібла, що відкриває нові можливості для створення екологічно чистих та біосумісних інгредієнтів, які відповідають трендам «чистої краси».

Ключовим результатом є розробка крему, що поєднує фенетиловий ефір кавової кислоти (CAPE), синтезований за допомогою отриманої ліпази, та біогенні наночастинки срібла. Така комбінація забезпечує подвійний терапевтичний ефект: CAPE ефективно знімає запалення та оксидативний стрес, тоді як срібло знищує патогенну мікрофлору. Цей комплексний підхід є значним досягненням у дерматокосметології, пропонуючи потужне рішення для лікування складних станів шкіри та боротьби з антимікробною резистентністю.

					НУХТ БТЕК 02.01.10 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Васильєва О.Л.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.І.				101	127
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
ВИСНОВКИ							

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Волкославська В.М., Гутнєв О.Л. (2013). Про стан захворюваності та особливості перебігу деяких дерматозів у підлітків в Україні. Відділ науково-аналітичної роботи у дерматології та венерології ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків.

Наказ № 312 від 08.05.2009 Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги хворим на дерматовенерологічні захворювання. Редакція від 01.09.2023. *ZakonOnline* – Право знати! [Електронний ресурс] Режим доступу: https://zakononline.com.ua/documents/show/77737___757725

Стрілець, О. П., & Стрельников, Л. С. (2023). Біотехнологічне отримання біосурфактантів (біоПАР)

Майже 1,5 млн людей живуть з псоріазом. Центр громадського здоров'я МОЗ України. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.phc.org.ua/news/mayzhe-15-mln-lyudey-v-ukraini-zhive-iz-psoriazom#:~:text=29>

О.О. Ошивалова «Акне», Державна наукова установа «Центр інноваційних технологій охорони здоров'я» Державного управління справами. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://clinic.gov.ua/akne/>

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced drug delivery reviews*, 58(15), 1688-1713. doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017

Acikara, Ö. B. (2013). Ion-exchange chromatography and its applications. *Column chromatography*, 10, 55744. DOI: 10.5772/55744

Akhter, M. S., Rahman, M. A., Ripon, R. K., Mubarak, M., Akter, M., Mahbub, S., ... & Sikder, M. T. (2024). A systematic review on green synthesis of silver nanoparticles using plants extract and their bio-medical applications. *Heliyon*, 10(11). doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29766

Alduraim, N. S., Bhat, R. S., Al-Zahrani, S. A., Elnagar, D. M., Alobaid, H. M., & Daghestani, M. H. (2023). Anticancer and antimicrobial activity of silver

nanoparticles synthesized from pods of *Acacia nilotica*. *Processes*, 11(2), 301. doi.org/10.3390/pr11020301

Alexis, A., Tan, J., Rocha, M., Kerob, D., Demessant, A. L., Ly, F., ... & Kurokawa, I. (2024). Is Acne the Same Around the World?. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 17(9), 16. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11386966/>

Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 11(2), 510. doi.org/10.3390/microorganisms11020510

Amini, Z., Ilham, Z., Ong, H. C., Mazaheri, H., & Chen, W. H. (2017). State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 141, 339-353. doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.049

Asif, M., Yasmin, R., Asif, R., Ambreen, A., Mustafa, M., & Umbreen, S. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), structural characterization, and their antibacterial potential. *Dose-Response*, 20(2), 15593258221088709. DOI:10.1177/15593258221088709

Abol-Fotouh, D., AlHagar, O. E., & Hassan, M. A. (2021). Optimization, purification, and biochemical characterization of thermoalkaliphilic lipase from a novel *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 for detergent formulations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 125-135. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.111

Acedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C., & van Belkum, M. J. (2018). The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 42(6), 805-828. DOI 10.1093/femsre/fuy033

Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., ... & Awan, A. R. (2020). Optimization of conditions for the higher level production of protease: characterization of protease from *Geobacillus* SBS-4 S. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 6613-6623. doi:10.1007/s12649-020-00935-4

Al-Amri, A., Al-Ghamdi, M. A., Khan, J. A., Altayeb, H. N., Alsulami, H., Sajjad, M., ... & Nadeem, M. S. (2021). Escherichia coli expression and characterization of α -amylase from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e239449. doi:10.1590/1519-6984.239449

Al-Jailawi, M. H., Nasir, H. M., & Aziz, G. M. (2015). Cytotoxic effect of biosurfactants produced by novel thermophilic *Geobacillus thermoleovorans* (JQ 912239). *Int J Adv Res*, 3, 632-7. Doi:10.21474/IJAR01/19616

Albasri, H. M., Almohammadi, A. A., Alhazmi, A., Bukhari, D. A., Waznah, M. S., & Mawad, A. M. (2024). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* bacterium isolated from Uhud mountain. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1358175. Doi:10.3389/fmicb.2024.1358175

Algan, M., Sürmeli, Y., & Şanlı-Mohamed, G. (2021). A novel thermostable xylanase from *Geobacillus vulcani* GS90: Production, biochemical characterization, and its comparative application in fruit juice enrichment. *Journal of Food Biochemistry*, 45(5), e13716. Doi:10.1111/jfbc.13716

Alkhalili, R. N., Bernfur, K., Dishisha, T., Mamo, G., Schelin, J., Canbäck, B., ... & Hatti-Kaul, R. (2016). Antimicrobial protein candidates from the Thermophilic *Geobacillus* sp. strain ZGt-1: production, proteomics, and bioinformatics analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1363. Doi:10.3390/ijms17081363

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2939-2951. DOI 10.1007/s00253-016-7343-9

Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., & Maugeri, T. L. (2009). An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology letters*, 123(2), 132-137. Doi:10.3389/fmicb.2015.01012

Arya, M., Chauhan, G., Fatima, T., Verma, D., & Sharma, M. (2024). Statistical Modelling of Thermostable Cellulase Production Conditions of

Thermophilic *Geobacillus* sp. TP-1 Isolated from Tapovan Hot Springs of the Garhwal Himalayan Mountain Ranges, India. *Indian Journal of Microbiology*, 1-12. Doi:10.1007/s12088-024-01258-x

Arya, M., Chauhan, G., Verma, U., & Sharma, M. (2024). Cloning, heterologous expression and purification of the novel thermo-alkalstable cellulase from *Geobacillus* sp. TP-3 and its molecular characterisation. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(1), 36. doi:10.1186/s43088-024-00495-9

Aytar, M., Başbülbul, G., & Uygün, D. A. (2024). Characterization and biological activities of a novel exopolysaccharide produced from *Geobacillus thermodenitrificans* HBB 111 strain. *Extremophiles*, 28(2), 27. Doi:10.1016/j.nbt.2020.11.004.

Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9-14. doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.018

Balcao, V. M., & Malcata, F. X. (1998). Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnology advances*, 16(2), 309-341. doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00064-5

Bartling, K., Thompson, J. U., Pfromm, P. H., Czermak, P., & Rezac, M. E. (2001). Lipase-catalyzed synthesis of geranyl acetate in n-hexane with membrane-mediated water removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(6), 676-681. doi:10.1002/bit.1193.

Baykasoğlu, C., Baykasoğlu, A., & Cetin, E. (2024). Multi-objective crashworthiness optimization of square aluminum tubes with functionally graded BCC lattice structure filler. *International Journal of Crashworthiness*, 29(1), 80-94. doi.10.1080/13588265.2023.2183801

Baran, A., Firat Baran, M., Keskin, C., Hatipoğlu, A., Yavuz, Ö., İrtegün Kandemir, S., ... & Eftekhari, A. (2022). Investigation of antimicrobial and cytotoxic properties and specification of silver nanoparticles (AgNPs) derived from *Cicer arietinum* L. green leaf extract. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 855136. doi.org/10.3389/fbioe.2022.855136

Boujtita, N., Saint-Herblain, F., Sicard, R., & Asheville, U. S. Rapid Harvesting of High Volume E. coli Cells when using Thermo Scientific Contifuge Stratos Continuous Flow Centrifuge. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://axeb.dk/wp-content/uploads/2014/05/Application-NoteE.Coli_.pdf

Bora, L., Gohain, D., & Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(11), 1959-1970. doi.org/10.1002/jctb.4170

Borin, G. P., de Melo, R. R., Crespim, E., Sato, H. H., & Contesini, F. J. (2018). An overview on polymer gels applied to enzyme and cell immobilization. *Polymer Gels: Science and Fundamentals*, 63-86. doi.org/10.1007/978-981-10-6086-1_2

Bio Tek H1 microplate spectrophotometer [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.agilent.com/en/product/microplate-instrumentation/microplate-readers/multimode-microplate-readers/biotek-synergy-h1-multimode-reader-1623193/synergyh1>

Başbülbül Özdemir, G., & Biyik, H. H. (2012). Isolation and characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Geobacillus toebii* strain HBB-247. *Indian journal of microbiology*, 52, 104-108.

Baykara, S. G., Sürmeli, Y., & Şanlı-Mohamed, G. (2021). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine protease from *Geobacillus* sp. GS53. *Applied biochemistry and biotechnology*, 193, 1574-1584. Doi:10.1007/s12010-021-03512-0

Bukhari, D. A., Bibi, Z., Ullah, A., & Rehman, A. (2024). Isolation, characterization, and cloning of thermostable pullulanase from *Geobacillus stearothermophilus* ADM-11. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 31(2), 103901. Doi.:10.1016/j.sjbs.2023.103901

Burhanoglu, T., Sürmeli, Y., & Şanlı-Mohamed, G. (2020). Identification and characterization of novel thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp.

GS33. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 578-585.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.171

Cai, X., Lin, L., Shen, Y., Wei, W., & Wei, D. Z. (2020). Functional expression of a novel methanol-stable esterase from *Geobacillus subterraneus* DSM13552 for biocatalytic synthesis of cinnamyl acetate in a solvent-free system. *BMC biotechnology*, 20, 1-10. doi:10.1186/s12896-020-00622-1

Calderón-Jiménez, B., Johnson, M. E., Montoro Bustos, A. R., Murphy, K. E., Winchester, M. R., & Vega Baudrit, J. R. (2017). Silver nanoparticles: Technological advances, societal impacts, and metrological challenges. *Frontiers in chemistry*, 5, 6. Doi:10.3389/fchem.2017.00006

Cekuolyte, K., Gudiukaite, R., Klimkevicius, V., Mazrimaite, V., Maneikis, A., & Lastauskiene, E. (2023). Biosynthesis of silver nanoparticles produced using *Geobacillus* spp. *Bacteria. Nanomaterials*, 13(4), 702. Doi:10.3390/nano13040702

Čekuolytė, K., Šapaitė, D., Žemgulytė, E., Gudiukaitė, R., & Lastauskienė, E. (2024). Induction of Apoptosis with Silver Nanoparticles Obtained Using Thermophilic Bacteria. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(6), 142. Doi:10.3390/jfb15060142

Cha, M., & Chambliss, G. H. (2013). Cloning and sequence analysis of the heat-stable acrylamidase from a newly isolated thermophilic bacterium, *Geobacillus thermoglucosidasius* AUT-01. *Biodegradation*, 24, 57-67. Doi:10.1007/s10532-012-9557-6

Chen, M., Zhang, J., Wang, J., Lin, L., Wei, W., Shen, Y., & Wei, D. (2022). A type I pullulanase from *Geobacillus subterraneus*: functional expression in *Escherichia coli*, Enzyme Characterization, Truncation, And Application. *Starch-Stärke*, 74(11-12), 2200044. doi:10.1002/star.202200044
doi:10.1002/star.202200044

Choi, D., & Kong, M. (2023). LysGR1, a novel thermostable endolysin from *Geobacillus stearothermophilus* bacteriophage GR1. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1178748. doi:10.3389/fmicb.2023.1178748

Correa-Llantén, D. N., Muñoz-Ibacache, S. A., Castro, M. E., Muñoz, P. A., & Blamey, J. M. (2013). Gold nanoparticles synthesized by *Geobacillus* sp. strain ID17 a thermophilic bacterium isolated from Deception Island, Antarctica. *Microbial cell factories*, *12*, 1-6. Doi:10.1186/1475-2859-12-75

Cortés-Antiquera, R., Márquez, S. L., Espina, G., Sánchez-SanMartín, J., & Blamey, J. M. (2023). Recombinant expression and characterization of a new laccase, bioinformatically identified, from the Antarctic thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. ID17. *Extremophiles*, *27*(2), 18. doi:10.1007/s00792-023-01299-y

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(2), 95-105. DOI 10.1038/nrmicro2937

Czinkóczy, R., & Németh, Á. (2023). Modeling the biosurfactant fermentation by *Geobacillus stearothermophilus* DSM2313. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, *67*(1), 104-115. Doi:10.3311/PPch.20797

Chen, H. C., Chen, J. H., Chang, C., & Shieh, C. J. (2011). Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, *18*(1), 455-459. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.018

Chicea, D., Nicolae-Maranciuc, A., Doroshkevich, A. S., Chicea, L. M., & Ozkendir, O. M. (2023). Comparative synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of chemical reduction procedures, AFM and DLS size analysis. *Materials*, *16*(15), 5244. doi.org/10.3390/ma16155244

Cong, S., Tian, K., Zhang, X., Lu, F., Singh, S., Prior, B., & Wang, Z. X. (2019). Synthesis of flavor esters by a novel lipase from *Aspergillus niger* in a soybean-solvent system. *3 Biotech*, *9*, 1-7. doi: 10.1007/s13205-019-1778-5

Corrêa, I. N. D. S., Lorena de Souza, S., Catran, M., Bernardes, O. L., Portilho, M. F., & Langone, M. A. P. (2011). Enzymatic biodiesel synthesis using a byproduct obtained from palm oil refining. *Enzyme Research*, *2011*(1), 814507. doi:10.4061/2011/814507

Dal Belo, S. E., Kanoun-Copy, L., Lambert, C., Cornillon, C., Muller, B., Jouni, H., ... & Aguilar, L. (2024). Efficacy of a multitargeted, salicylic acid-based dermocosmetic cream compared to benzoyl peroxide 5% in Acne vulgaris: results from a randomized study. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 23(3), 891-897. doi.org/10.1111/jocd.16052

Duda, L. V., & Okhotnikova, E. N. (2018). *Clinical and epidemiological characteristics of the most common allergy diseases in children. ChildS health*, 13 (4), 345-355. doi.org/10.22141/2224-0551.13.4.2018.137017

Doukyu, N., Ito, H., & Sugimoto, K. (2024). Expression and characterization of a thermostable monoacylglycerol lipase from thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-9. doi:10.1080/10826068.2024.2361147

Druteika, G., Sadauskas, M., Malunavicius, V., Lastauskiene, E., Taujenis, L., Gegeckas, A., & Gudiukaite, R. (2020). Development of a new *Geobacillus lipase* variant GDlip43 via directed evolution leading to identification of new activity-regulating amino acids. *International journal of biological macromolecules*, 151, 1194-1204. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.163

Elemosho, R., Suwanto, A., & Thenawidjaja, M. (2021). Extracellular expression in *Bacillus subtilis* of a thermostable *Geobacillus stearothermophilus* lipase. *Electronic Journal of Biotechnology*, 53, 71-79. doi:10.1016/j.ejbt.2021.07.003

Fayaz, A. M., Girilal, M., Rahman, M., Venkatesan, R., & Kalaichelvan, P. T. (2011). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry*, 46(10), 1958-1962. Doi:10.1016/j.procbio.2011.07.003

Garg, N., Tang, W., Goto, Y., Nair, S. K., & Van Der Donk, W. A. (2012). Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5241-5246

Gharib, G., Chohan, S. M., Rashid, N., & Akhtar, M. (2020). Heterologous gene expression and characterization of recombinant aspartate aminotransferase

from *Geobacillus thermopakistanensis*. *Protein Expression and Purification*, 175, 105709. doi:10.1016/j.pep.2020.105709

Ghasemi, S. M., Dormanesh, B., Hosseini Abari, A., Aliasghari, A., & Farahnejad, Z. (2018). Comparative characterization of silver nanoparticles synthesized by spore extract of *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus*. *Nanomedicine Journal*, 5(1), 46-51. DOI:10.22038/nmj.2018.05.007

Girilal, M., Fayaz, A. M., Balaji, P. M., & Kalaichelvan, P. T. (2013). Augmentation of PCR efficiency using highly thermostable gold nanoparticles synthesized from a thermophilic bacterium, *Geobacillus stearothermophilus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, 165-169 Doi:10.1016/j.colsurfb.2012.12.038

Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2002). Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical biochemistry*, 311(1), 98-99. DOI:10.1016/S0003-2697(02)00379-2

Gupta, A., Koirala, A. R., Gupta, B., & Parajuli, N. (2019). Improved method for separation of silver nanoparticles synthesized using the *Nyctanthes arbor-tristis* shrub. *Acta Chemica Malaysia*, 3(1), 35-42. DOI: 10.2478/acmy-2019-0005

Hagenström, K., Müller, K., Klinger, T., Stephan, B., & Augustin, M. (2024). Epidemiology and Healthcare of Juvenile and Late-Onset Acne: Claims Data Analysis. *Dermatology and Therapy*, 1-15. doi.org/10.1007/s13555-024-01284-z

Hümmer, M., Kara, S., Liese, A., Huth, I., Schrader, J., & Holtmann, D. (2018). Synthesis of (-)-menthol fatty acid esters in and from (-)-menthol and fatty acids—novel concept for lipase catalyzed esterification based on eutectic solvents. *Molecular catalysis*, 458, 67-72. doi.org/10.1016/j.mcat.2018.08.003

Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H., & Peschel, A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 726-739. Doi:10.1038/s41579-021-00569-w

Husain, N. A. C., Jamaluddin, H., & Jonet, M. A. (2024). Functional and structural characterization of a thermostable flavin reductase from *Geobacillus*

mahadii Geo-05. *International Journal of Biological Macromolecules*, 275, 133721. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.133721.

Hussein, A. H., Lisowska, B. K., & Leak, D. J. (2015). The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Advances in applied microbiology*, 92, 1-48. Doi:10.1016/bs.aambs.2015.03.001

Ishak, S. N. H., Kamarudin, N. H. A., Ali, M. S. M., Leow, A. T. C., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2020). Ion-pair interaction and hydrogen bonds as main features of protein thermostability in mutated T1 recombinant lipase originating from *Geobacillus zalihae*. *Molecules*, 25(15), 3430. doi:10.3390/molecules25153430

Ishak, S. N. H., Masomian, M., Kamarudin, N. H. A., Ali, M. S. M., Leow, T. C., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2019). Changes of thermostability, organic solvent, and pH stability in *Geobacillus zalihae* HT1 and its mutant by calcium ion. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2561. doi.org/10.3390/ijms20102561

Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 315-351. doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315

Jun, W. A. N. G., Jing, L. I., Shuangshuang, G. U., & Fuan, W. U. (2013). Lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester in ionic liquids: effect of specific ions and reaction parameters. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(12), 1376-1385. doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60563-7

Jeon, S. J., & Park, J. H. (2020). Refolding, characterization, and dye decolorization ability of a highly thermostable laccase from *Geobacillus* sp. JS12. *Protein Expression and Purification*, 173, 105646. doi:10.1016/j.pep.2020.105646

Jeon, S. J., Park, A. K., Kim, B. K., Park, H., Lee, J. H., Kim, H. W., & Shin, S. C. (2016). Complete genome sequence of the crude oil-degrading thermophilic

bacterium *Geobacillus* sp. JS12. *Journal of Biotechnology*, 230, 28-29. Doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.013

Jo, E., Kim, J., Lee, A., Moon, K., & Cha, J. (2021). Identification and characterization of a novel thermostable GDSL-type lipase from *Geobacillus thermocatenulatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 483. doi:10.4014/jmb.2012.12036

Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., & Tommonaro, G. (2009). Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 338-343. Doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.004

Karadayi, Y. I., Aykutoglu, G., Arslan, N. P., Baltaci, M. O., Adiguzel, A., & Taskin, M. (2021). Production of water-soluble sulfated exopolysaccharide with anticancer activity from *Anoxybacillus gonensis* YK25. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(5), 1258-1266. Doi:10.1002/jctb.6638

Kaunietis, A. (2018). *Identification, heterologous biosynthesis and characterization of novel bacteriocins from thermophilic bacteria* (Doctoral dissertation, Vilniaus universitetas).

Kumar, A., Bhanja Dey, T., Mishra, A. K., Meena, K. R., Mohapatra, H. S., & Kuhad, R. C. (2024). Optimization and Characterization of an Ultra-Thermostable, Acidophilic, Cellulase-Free Xylanase from a New Obligate Thermophilic *Geobacillus thermoleovorans* AKNT10 and its Application in Saccharification of Wheat Bran. *Current Microbiology*, 81(9), 287. Doi:10.1007/s00284-024-03792-9

Kumar, A., Prasad, B., Manjhi, J., & Prasad, K. S. (2020). Antioxidant activity of selenium nanoparticles biosynthesized using a cell-free extract of *Geobacillus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 102(10), 556-567. Doi:10.1080/02772248.2020.1829623

Kurniawan, D. C., Rohman, M. S., & Witasari, L. D. (2024). Heterologous expression, characterization, and application of recombinant thermostable α -

amylase from *Geobacillus* sp. DS3 for porous starch production. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 39, 101784. doi:10.1016/j.bbrep.2024.101784

Kakpovbia, E. E., Young, T., Milam, E. C., Qian, Y., Yassin, S., Nicholson, J., ... & Nagler, A. R. (2025). Efficacy of topical treatments for mild-to-moderate acne: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 39(4), 775-784. doi.org/10.1111/jdv.20154

Khan, K. A., Haider, M. T., Hossain, M. S., & Rasel, S. R. (2023). Synthesis, Characterizations of Silver Nanoparticles (AgNPs) and Monitoring for Power Production Using Drumstick Leaves. In *Microelectronics, Circuits and Systems: Select Proceedings of Micro2021* (pp. 145-158). Singapore: Springer Nature Singapore. doi.org/10.1007/978-981-99-0412-9_13

Khan, N. R., & Rathod, V. K. (2015). Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochemistry*, 50(11), 1793-1806. doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.014

Kim, H. J., & Kim, Y. H. (2024). Exploring acne treatments: From pathophysiological mechanisms to emerging therapies. *International journal of molecular sciences*, 25(10), 5302. doi.org/10.3390/ijms25105302

Kirk, N., & Cowan, D. (1995). Optimising the recovery of recombinant thermostable proteins expressed in mesophilic hosts. *Journal of biotechnology*, 42(2), 177-184. doi.org/10.1016/0168-1656(95)00078-5

Kucera, K., Zenzola, N., Hudspeth, A., Dubnicka, M., Hinz, W., Bunick, C. G., ... & Light, D. Y. (2024). Benzoyl peroxide drug products form benzene. *Environmental Health Perspectives*, 132(3), 037702. doi.org/10.1289/EHP1398

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [Электронный ресурс]
Режим доступа: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.1.1.3

Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., Lakshmi priya, T., & Tang, T. H. (2015). Lipase-Secreting Bacillus Species in an Oil-Contaminated

Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. *BioMed research international*, 2015(1), 820575. doi.org/10.1155/2015/820575

Liu, W., Li, M., & Yan, Y. (2017). Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and used for biodiesel production. *Scientific reports*, 7(1), 15711. doi.org/10.1038/s41598-017-16036-7

Liu, Y., WeiZhuo, X., & Wei, X. (2022). A review on lipase-catalyzed synthesis of geranyl esters as flavor additives for food, pharmaceutical and cosmetic applications. *Food Chemistry Advances*, 1, 100052. doi.org/10.1016/j.focha.2022.100052

Lai, R., Lin, M., Yan, Y., Jiang, S., Zhou, Z., & Wang, J. (2023). Comparative genomic analysis of a thermophilic protease-producing strain *Geobacillus stearothermophilus* H6. *Genes*, 14(2), 466. doi:10.3390/genes14020466

Li, J. Y., Liu, Y. F., Zhou, L., Gang, H. Z., Liu, J. F., Sun, G. Z., ... & Mu, B. Z. (2023). Structural diversity of the lipopeptide biosurfactant produced by a newly isolated strain, *Geobacillus thermodenitrificans* ME63. *ACS omega*, 8(24), 22150-22158. Doi:10.1021/acsomega.3c02194

Logan, N. A., Vos, P. D., & Dinsdale, A. (2015). *Geobacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-26. Doi:10.1002/9781118960608.gbm00533

¹Majid Hussein, A. J., Nasir, M., & Aziz, M. (2015). Characterization of biosurfactant produced by a novel thermophilic strain (*Geobacillus thermoleovorans* JQ 912239). *Asian Journal of Biotechnology*, 7(3), 96-107. DOI:10.3923/ajbkr.2015.96.107

Manchola, L., & Dussán, J. (2014). *Lysinibacillus sphaericus* and *Geobacillus* sp biodegradation of petroleum hydrocarbons and biosurfactant production. *Remediation Journal*, 25(1), 85-100. Doi:10.1002/rem.21416

Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in microbiology*, 6, 1012. Doi:10.3389/fmicb.2015.01012

Manzari, R. C., & O'Donnell, J. K. (2015). SEC in the modern downstream purification process. *BioPharm International*, 28(3), 34-37. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.biopharminternational.com/view/sec-modern-downstream-purification-process>

Marín-Sánchez, J., Berzosa, A., Álvarez, I., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2024). Pulsed Electric Fields Effects on Proteins: Extraction, Structural Modification, and Enhancing Enzymatic Activity. *Bioelectricity*, 6(3), 154-166. doi.org/10.1089/bioe.2024.002

Martins, C. S., Sousa, H. B., & Prior, J. A. (2021). From Impure to Purified Silver Nanoparticles: Advances and Timeline in Separation Methods. *Nanomaterials*, 11(12), 3407. doi.org/10.3390/nano11123407

McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 1, pp. 347-360). Academic Press. doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80073-3

Melnyk, N., Vlasova, I., Skowrońska, W., Bazyłko, A., Piwowarski, J. P., & Granica, S. (2022). Current knowledge on interactions of plant materials traditionally used in skin diseases in Poland and Ukraine with human skin microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9644. doi.org/10.3390/ijms23179644

Nimkande, V. D., & Bafana, A. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102591. doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591

Najar, I. N., & Thakur, N. (2020). A systematic review of the genera *Geobacillus* and *Parageobacillus*: their evolution, current taxonomic status and major applications. *Microbiology*, 166(9), 800-816. DOI 10.1099/mic.0.000945

Najm, T. A., & Walsh, M. K. (2022). Characterization of Lipases from *Geobacillus stearothermophilus* and *Anoxybacillus flavithermus* cell Lysates. *Food and Nutrition Sciences*, 13(3), 238-251. DOI:10.4236/fns.2022.133020

Oren, A., & Garrity, G. M. (2017). Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(1), 7-8. DOI 10.1099/ijsem.0.001710

Özdemir, G. B., & Biyik, H. H. (2012). Isolation and characterization of toebicin 218, a bacteriocin, produced by *Geobacillus toebii* HBB-218. *African Journal of Biotechnology*, 11(30), 7711. DOI: 10.5897/AJB11.1331

Özdemir, F. İ., Karaaslan, B., Tülek, A., Yucebilgic, G., & Yildirim, D. (2023). Immobilization of recombinant L-asparaginase from *Geobacillus kaustophilus* on magnetic MWCNT-nickel composites. *Process Biochemistry*, 127, 10-20. doi:10.1016/j.procbio.2023.01.021

Özdemir, F. İ., Orhan, M. D., Atasavum, Z. T., & Tülek, A. (2022). Biochemical characterization and detection of antitumor activity of l-asparaginase from thermophilic *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T. *Protein Expression and Purification*, 199, 106146. doi:10.1016/j.pep.2022.106146

Olgierd, B., Kamila, Ż., Anna, B., & Emilia, M. (2021). The pluripotent activities of caffeic acid phenethyl ester. *Molecules*, 26(5), 1335. doi: 10.3390/molecules26051335

Palacios, D., Busto, M. D., & Ortega, N. (2014). Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 536-542. doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.027

Panyachanakul, T., Kitpreechavanich, V., Lorliam, W., Lomthong, T., & Krajangsang, S. (2024). Optimization, Purification and Characterization of Lipase from *Streptomyces* sp. A3301, with Application of Crude Lipase for Cooking Oily Wastewater Treatment. *Trends in Sciences*, 21(11), 8504-8504. doi.org/10.48048/tis.2024.8504

Patel, V., Gajera, H., Gupta, A., Manocha, L., & Madamwar, D. (2015). Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: Process parameters and reusability

studies. *Biochemical Engineering Journal*, 95, 62-70.
doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.007

Panosyan, H., Di Donato, P., Poli, A., & Nicolaus, B. (2018). Production and characterization of exopolysaccharides by *Geobacillus thermodenitrificans* ArZA-6 and *Geobacillus toebii* ArZA-8 strains isolated from an Armenian geothermal spring. *Extremophiles*, 22, 725-737. Doi:10.1007/s00792-018-1032-9

Pasri, J., Champasri, C., & Trongpanich, Y. (2022). Cloning and Characterization of Pyridoxal Kinase from *Geobacillus* sp. H6a. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(1). doi:10.22207/JPAM.16.1.30

Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13, 1-13. DOI 10.1186/1475-2859-13-S1-S3

Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kananavičiūtė, R., Lebedeva, J., Kuisienė, N., & Šaleikienė, J. (2015). Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences.*, 5(2), 155-161. DOI 10.15414/jmbfs.2015.5.2.155-161

Rajashekarappa, K. K., SE, N., DM, G., & Kumar, P. (2024). Production of Industry-Viable Thermo-Amylase from *Geobacillus stearothermophilus* KTRAM Using Agricultural By-Product as a Substrate. *Industrial Biotechnology*. Doi:10.1089/ind.2024.0018

Rathod, S., Preetam, S., Pandey, C., & Bera, S. P. (2024). Exploring synthesis and applications of green nanoparticles and the role of nanotechnology in wastewater treatment. *Biotechnology Reports*. Doi:10.1016/j.btre.2024.e00830

Rahdar, A., Amini, N., Askari, F., & Susan, M. A. B. H. (2019). Dynamic light scattering: A useful technique to characterize nanoparticles. *Journal of Nanoanalysis*, 6(2), 80-89. DOI 10.22034/jna.2019.667079

Rodriguez-Loya, J., Lerma, M., & Gardea-Torresdey, J. L. (2023). Dynamic light scattering and its application to control nanoparticle aggregation in colloidal systems: a review. *Micromachines*, 15(1), 24. doi.org/10.3390/mi15010024

Sadaf, S., Iqbal, J., Ullah, I., Bhatti, H. N., Nouren, S., Nisar, J., & Iqbal, M. (2018). Biodiesel production from waste cooking oil: an efficient technique to convert waste into biodiesel. *Sustainable cities and society*, *41*, 220-226. doi.org/10.1016/j.scs.2018.05.037

Salas-Bruggink, D., Guzmán, H., Espina, G., & Blamey, J. M. (2024). Recombinant Expression and Characterization of a Novel Thermo-Alkaline Lipase with Increased Solvent Stability from the Antarctic Thermophilic Bacterium *Geobacillus* sp. ID17. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(14), 7928. doi.org/10.3390/ijms25147928

Sari, T. P., Gaur, V. K., Tarafdar, A., Sirohi, R., Sindhu, R., & Rai, A. K. (2023). Microbial Lipases: Production and Application. In *Microbial Enzymes and Metabolites for Health and Well-Being* (pp. 75-90). CRC Press.

Salas-Bruggink, D., Guzmán, H., Espina, G., & Blamey, J. M. (2024). Recombinant Expression and Characterization of a Novel Thermo-Alkaline Lipase with Increased Solvent Stability from the Antarctic Thermophilic Bacterium *Geobacillus* sp. ID17. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(14), 7928. doi:10.3390/ijms25147928

Sania, A., Muhammad, M. A., Sajed, M., Azim, N., Ahmad, N., Aslam, M., ... & Rashid, N. (2024). Structural and functional analyses of an L-asparaginase from *Geobacillus thermopakistaniensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *263*, 130438. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.130438

Silpa, S. (2016). Nanotechnology-present revolutionary biotechnology. *Int J Pharma Res Health Sci*, *4*(4), 1261-1267. DOI:10.21276/ijprhs.2016.04.03

Sürmeli, Y., Tekedar, H. C., & Şanlı-Mohamed, G. (2024). Sequence identification and in silico characterization of novel thermophilic lipases from *Geobacillus* species. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *71*(1), 162-175. Doi:10.1002/bab.2529

Schottroff, F., Kastenhofer, J., Spadiut, O., Jaeger, H., & Wurm, D. J. (2021). Selective release of recombinant periplasmic protein from *E. coli* using continuous

pulsed electric field treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 586833. doi.org/10.3389/fbioe.2020.586833

Sharifi-Rad, M., Pohl, P., & Epifano, F. (2021). Phytofabrication of silver nanoparticles (AgNPs) with pharmaceutical capabilities using *Otostegia persica* (burm.) Boiss. leaf extract. *Nanomaterials*, 11(4), 1045. doi.org/10.3390/nano11041045

Srikanth, S., Giri, D., Pal, D., Mishra, P. and Upadhyay, S. (2016) Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry*, 6, 34-56. doi:10.4236/gsc.2016.61004

Taravati, A., & Ebadi, A. G. (2007). Stability and storage conditions of protein. *International Journal of Biology and Biotechnology (Pakistan)*, 4(2-3). [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ijbbku.com/assets/custom/journals/2007/2-3/SHORT%20REPORT%20STABILITY%20AND%20STORAGE%20CONDITIONS%20OF%20PROTEIN.pdf>

Tang, W., Lan, D., Zhao, Z., Li, S., Li, X., & Wang, Y. (2019). A thermostable monoacylglycerol lipase from marine *Geobacillus* sp. 12AMOR1: biochemical characterization and mutagenesis study. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 780. doi:10.3390/ijms20030780

Tawangalun, A. T., Maskoen, A. M., Rachmawati, E., Arumimaniyah, C., Asarina, S., Safitri, R., & Yuliana, T. (2024). Optimized Novel Antibacterial Production from *Geobacillus kaustophilus* Tm6T2 (a) as Treatment for *Salmonella typhimurium*. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 30(3), 250-254. doi:10.24293/ijcpml.v30i3.2202

Tiquia-Arashiro, S., Rodrigues, D. F., Tiquia-Arashiro, S., & Rodrigues, D. (2016). Thermophiles and psychrophiles in nanotechnology. *Extremophiles: applications in nanotechnology*, 89-127. Doi.:10.1007/978-3-319-45215-9_3

Tülek, A., Özdemir, F. I., & Ramadhan, S. S. (2020). Cloning, expression and characterization of membrane bound FtsH protease of *Geobacillus*

kaustophilus. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56, 678-684.
doi:10.1007/s12010-021-03512-0

Temova Rakuša, Ž., Škufca, P., Kristl, A., & Roškar, R. (2021). Retinoid stability and degradation kinetics in commercial cosmetic products. *Journal of cosmetic dermatology*, 20(7), 2350-2358. doi.org/10.1111/jocd.13852

Tempark, T., Shem, A., & Lueangarun, S. (2024). Efficacy of ceramides and niacinamide-containing moisturizer versus hydrophilic cream in combination with topical anti-acne treatment in mild to moderate acne vulgaris: A split face, double-blinded, randomized controlled trial. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 23(5), 1758-1765. doi.org/10.1111/jocd.16212

Tripon, M. R., Tulcan, C., Marc, S., Camen, D. D., & Paul, C. (2025). “One Pot” Enzymatic Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Deep Eutectic Solvent. *Biomolecules*, 15(2), 181. doi:10.3390/biom15020181

Vaičikauskaitė, M., Ger, M., Valius, M., Maneikis, A., Lastauskienė, E., Kalėdienė, L., & Kaunietis, A. (2019). Geobacillin 26-high molecular weight bacteriocin from a thermophilic bacterium. *International journal of biological macromolecules*, 141, 333-344.

Vescovi, V., Rojas, M. J., Baraldo Jr, A., Botta, D. C., Santana, F. A. M., Costa, J. P., ... & Tardioli, P. W. (2016). Lipase-catalyzed production of biodiesel by hydrolysis of waste cooking oil followed by esterification of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(12), 1615-1624. doi.org/10.1007/s11746-016-2901-y

Vladuti, A., Hatami, A., Clément, A., & Mainzer, C. (2024). A Pilot Study on the Comparative Efficacy and Tolerability of a Novel Dermo-cosmetic Cream with 15% Azelaic Acid for Mild to Moderate Acne: A New Approach to Acne Treatment. *Dermatology and Therapy*, 14(11), 3149-3160. doi.org/10.1007/s13555-024-01294-x

Voulgaris, I., Chatel, A., Hoare, M., Finka, G., & Uden, M. (2016). Evaluation of options for harvest of a recombinant E. coli fermentation producing a domain

antibody using ultra scale-down techniques and pilot-scale verification. *Biotechnology Progress*, 32(2), 382-392. doi.org/10.1002/btpr.2220

Yevtushenko, Y. V., Litus, V. I., Litus, O. I., & Kovalenko, O. Y. (2023). ATOPIC DERMATITIS: CURRENT STATE OF THE PROBLEM IN UKRAINE AND THE WORLD. doi.org/10.31612/2616-4868.5.2023.14

Youssif, A. M., Soliman, N. A., Sabry, S. A., & Ghozlan, H. A. (2020). Biosynthesis, characterization and application of silver nanoparticles by *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 as antimicrobial, antibiofilm and dye catalyist. *Asian J. Microbiol. Biotech. Environ. Sci*, 22, 50-56. [Электронный ресурс] Режим доступу: <https://www.envirobiotechjournals.com/AJMBES/vol22i12020/AJ-8.pdf>

Zaidi, A., Gainer, J. L., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., & Mir, A. (2002). Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. *Journal of biotechnology*, 93(3), 209-216. doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00401-1

Zhu, Z., Zhong, X., Luo, Z., Liu, M., Zhang, H., Zheng, H., & Li, J. (2025). Global, regional and national burdens of acne vulgaris in adolescents and young adults aged 10–24 years from 1990 to 2021: a trend analysis. *British Journal of Dermatology*, 192(2), 228-237. doi.org/10.1093/bjd/ljae352

Zydney, A. L., & Kuriyel, R. (2000). 3 Protein Concentration and Buffer Exchange Using Ultrafiltration. *Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocols*, 23-34. doi.org/10.1007/978-1-59259-027-8_3

Wang, W., Dasetty, S., Sarupria, S., & Blenner, M. (2021). Rational engineering of low temperature activity in thermoalkalophilic *Geobacillus thermocatenulatus* lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 174, 108093. doi:10.1016/j.bej.2021.108093

Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2021). Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New Biotechnology*, 61, 29-39. Doi:10.1016/j.nbt.2020.11.004

Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2020). Synthesis of biopolymers from a *Geobacillus* sp. WSUCF1 using unprocessed corn stover. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(25), 9483-9496. Doi:10.1021/acssuschemeng.0c02435

Wang, L., Zhang, H., Yang, L., Liang, X., Zhang, F., & Linhardt, R. J. (2017). Structural characterization and bioactivity of exopolysaccharide synthesized by *Geobacillus* sp. TS3-9 isolated from radioactive radon hot spring. *Adv. Biotechnol. Microbiol*, 4(2), 1-8. Doi:10.19080/AIBM.2017.04.55563

Youssif, A. M., Soliman, N. A., Sabry, S. A., & Ghozlan, H. A. (2020). Biosynthesis, Characterization And Application Of Silver Nanoparticles By *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 As Antimicrobial, Antibiofilm And Dye Catalyist. *Asian J. Microbiol. Biotech. Environ. Sci*, 22, 50-56.