

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

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)

(підпис) **Наталія ГРЕГІРЧАК**
(прізвище та ініціали)

« 02 » грудня 2024р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

(підпис) **Віктор СТАБНІКОВ**
(прізвище та ініціали)

« 02 » грудня 2024р.

**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: «Біотехнологія ферментів для косметичних засобів»

Виконав: здобувач II курсу, групи 1

ТРОМПАК Вероніка Юріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) _____
(підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) _____
(підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) _____
(підпис)

(прізвище та ініціали) _____
(підпис)

Рецензент ЛОМБЕРГ М. Л.
(прізвище та ініціали) _____
(підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2024р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТРОМПАК Вероніки Юріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологія ферментів для косметичних засобів»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доцент,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 7 жовтня 2024 року № 875-к

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи штам *Rhizopus sp.* 2000 ФМ для створення косметичного засобу – очищувального гелю з ліпазою у складі.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Застосування мікробних ферментів у косметології, РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти ожержання ферментів для космецевтики, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів, РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми, РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання готового продукту, РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва, РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на корисну модель, Висновки.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічні схеми: технологія післяферментаційних етапів одержання високоочищеного порошку ліпази – 1 аркуш А3; технологія отримання косметичного очищувального гелю з ліпазою у складі – 1 аркуш А4. Апаратурні схеми: технологія післяферментаційних етапів одержання високоочищеного порошку ліпази – 1 аркуш А1; технологія отримання косметичного очищувального гелю з ліпазою у складі – 1 аркуш А3.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Застосування мікробних ферментів у косметології	8.10.24 р. – 10.10.24 р.	
2	РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти одержання ферментів для космецевтики	11.10.24 р. – 14.10.24 р.	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	15.10.24 р. – 18.10.24 р.	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції ліпази	19.10.24 р. – 24.10.24 р.	
5	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми	25.10.24 р. – 29.10.24 р.	
6	РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості одержанняочищувального гелю з ліпазою у складі	30.10.24 р. – 04.11.24 р.	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	05.11.24 р. – 08.11.24 р.	
8	РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель	09.11.24 р. – 14.11.24 р.	
9	Оформлення апаратурних та технологічних схем	15.11.24 р. – 19.11.24 р.	
10	Оформлення вступу та реферату	20.11.24 р. – 22.11.24 р.	

Здобувач _____
(підпис)

Вероніка ТРОМПАК
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The thesis is devoted to the peculiarities of obtaining lipase for a cosmetic cleansing gel. This enzyme, as one of the active components, is able to break down fats (triglycerides), thereby removing dirt and small dead keratinized skin flakes.

The biosynthesis of the lipase enzyme is carried out using *Rhizopus* sp. 2000 FM fungi, which synthesize an extracellular enzyme, which is then isolated in a highly purified form. The isolation and purification scheme is as follows: centrifugation of the culture fluid, ultrafiltration, precipitation with ammonium sulfate, separation of the precipitate by centrifugation, ion-exchange chromatography, drying and packaging, packaging.

The finished product is a cleansing gel with lipase in its composition, made for daily facial cleansing. It cleanses the skin well, soothes it, and does not irritate it. The unique composition of the product, the process of obtaining, filling, and packaging the gel have been selected.

ENZYMES, LIPASE, CLEANSING GEL, EXTRACTION, PURIFICATION, BIOSYNTHESIS

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена особливостям отримання ферментів для косметичної галузі. А саме очищувального гелю для вмивання з ліпазою у складі, як одною з активних компонентів. Даний ензим виконує очищувальну функцію за рахунок здатності розщеплювати жири (тригліцериди). Ліпаза в косметичному засобі відповідає за розм'якшення, видалення бруду та дрібних лусочок мертвої ороговілої шкіри.

Біосинтез ферменту ліпази здійснюється із використанням грибів *Rhizopus sp.* 2000 ФМ, який у порівнянні з іншими штамми дає високу ліполітичну активність ферменту на простому, дешевому середовищі. Дані мікроміцети синтезують позаклітинний ензим, який виділяють у високоочищеному вигляді. Схема очищення така: центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація, осадження сульфатом амонію, відокремлення осаду центрифугуванням, іонообмінна хроматографія, сушіння та фасування, пакування.

Готовий продукт – очищувальний гель з ліпазою у складі, виготовляють для щоденного вмивання шкіри обличчя. Він добре очищує шкіру, заспокоює її, не подразнює. Підібрано унікальний склад засобу, процес отримання, фасування та пакування гелю.

Робота складається зі вступу, восьми розділів, а також списку використаної літератури (89 джерел), технологічної схеми одержання субстанції (формат А3, 1 аркуш), апаратурної схеми одержання субстанції (формат А1, 1 аркуш), апаратурної схеми одержання готового продукту (формат А3, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи 95 сторінок, в тому числі 12 таблиць, 9 рисунок.

Ключові слова: ферменти, ліпаза, очищувальний гель, виділення, очищення, біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	8
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1 ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОБНИХ ФЕРМЕНТІВ У КОСМЕТОЛОГІЇ	12
1.1. Переваги мікробних ферментів для косметології над рослинними і тваринними	17
РОЗДІЛ 2 БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТІВ ДЛЯ КОСМЕЦЕВТИКИ.....	22
2.1. Продуценти ферментів для космеології.....	24
2.2. Способи культивування мікроорганізмів для одержання ферментів для косметології	27
2.3. Виділення та очищення ферментів для косметичних засобів	30
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	34
3.1. Характеристика ліпази.....	34
3.2. Розрахунок потреби ліпази.....	36
3.3. Розрахунок річної потужності виробництва ліпази.....	38
РОЗДІЛ 4 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ЛІПАЗИ	44
4.1. Підбір технологічного обладнання з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	52
4.2. Специфікація обладнання.....	55
РОЗДІЛ 5 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛІПАЗИ.....	60
РОЗДІЛ 6 ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ОЧИЩУВАЛЬНОГО ГЕЛЮ З ЛІПАЗОЮ У СКЛАДІ.....	64
6.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки косметичного гелю	64
6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання очищувального гелю	66
6.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва очищувального гелю.....	68

6.4. Специфікація обладнання.....	69
6.5. Опис технологічної схеми отримання очищувального гелю	70
РОЗДІЛ 7 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	72
7.1. Підбір сучасних методів контролю порошку мікробної ліпази	75
7.2. Методи контролю очищувального гелю з ліпазою у складі.....	77
РОЗДІЛ 8 ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСТНУ МОДЕЛЬ	80
ВИСНОВКИ.....	85
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	86

ВСТУП

Значущість ферментів завжди зростає, особливо мікробних, тому що біотехнологічний метод одержання ферментних препаратів є найкращим за економічністю і ефективністю. (Дехтяренко&Пескова, 2014)

На сьогодні відомий ряд ферментів, які широко застосовуються у складі косметичних засобів. Це, наприклад, протеази (для видалення відмерлих клітин шкіри), ліпази (у засобах для догляду за шкірою), лакази (наявні у складі фарб для волосся), кератинази (сприяють вирівнюванню мікрорельєфу та поліпшенню кольору обличчя та якісних характеристик шкіри в цілому), гіалуронідази (використовуються для корекції естетичних проблем шкіри та усунення патологічних станів сполучної тканини). Вони використовуються як у звичайних кремах, гелях, скрабах, шампунях, так і у фарбах для волосся, зубних пастах, лаках для нігтів. Серед ряду ферментів для косметології (ліпази, протеази, кератинази, гіалуронідази, лаккази) особливу цікавість представляють ліпази.

Ліпаза (ЕС3.1.1.3) – це фермент, який розщеплює жири (ліпіди) на більш прості складові частини: жирні кислоти та гліцерин. Вона належить до класу гідролаз і також відома як жиророзщеплювач, гідролаза складного ефіру гліцерину або триацилгліцерол гідроліз тригліцеридів. (Javed S. та ін., 2018)

Ліпази в косметології – це надактивні ферменти, які використовують у косметичних засобах для догляду за шкірою. Вони розщеплюють жири (тригліцериди), і в складі косметичних засобів виконують дві дуже важливі функції: жироспалюючу та очищуючу. Потрапляючи в більш глибокі товщі епідермісу і дерми, ліпаза гальмує синтез нових адипоцитів і, тим самим, попереджає «розростання» жирової тканини. Це все дає змогу використовувати цей ензим в якості активного компонента формул гелів та кремів, призначених на боротьбу з целюлітом, а також для поліпшення якості та структури шкіри. (Sunar K. та ін., 2016)

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромбак В.Ю</i>			ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					8	95
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						
					Кафедра БТМ			

Інша роль ліпази – допомога у розщепленні жирів бруду на поверхні шкіри, що може поліпшувати її текстуру, очищувати пори і зменшувати видимість недосконалостей, як от, наприклад, акне чи чорні цятки. Завдяки своїй можливості впливати на ліпіди, ліпаза застосовується для глибокого очищення шкіри та зменшення її жирності, що робить використання ензиму особливо корисним для людей із жирною або комбінованою шкірою.

На даний час в Україні промисловий біосинтез ензимів ліполітичного комплексу не найкращий. Існує лише один завод з виробництва ферментних препаратів («Ензим», Ладизин). Обмежувальним чинником у виробництві ліпаз є нестача високоактивних мікроорганізмів-продуцентів із певними характеристиками, потрібними для косметичної галузі. Тому на сьогоднішній день, є потреба в стабільних промислово важливих мікроорганізмах, продуцентах ліпази. (Дехтяренко&Пескова, 2014) Перевагами біосинтезу ліполітичних ензимів є висока швидкість росту культурального штаму, високий вихід продукту, легше виділення і очищення та можливості здійснення генетичних маніпуляцій з мікроорганізмами.

Можливими продуцентами ліпаз мікробного походження є гриби, бактерії та актиноміцети. За літературними даними більшість бактерій здатні накопичувати внутрішньоклітинну ліпазу, в той час як актиноміцети, гриби та дріжджі — здебільшого позаклітинну, яку легше виділяти і очищати. Однак для бактерій характерний більш швидкий ріст, а тому і швидше утворення ліпази (24 – 48 годин) у порівнянні з мікроміцетами (72 – 96 год) (Борисенко А. В. та ін., 2010).

Теперішні біотехнології дозволяють виділяти з продуцентів ензими будь-якого типу з необхідними характеристиками, тому більший відсоток досліджень зосереджено саме на їх використання. Ключовими чинниками максимального виходу потрібного ферменту є не тільки вибір високоактивного продуцента, але і створення найкращих умов його вирощування, з врахуванням вмісту поживного середовища, віку інокуляту, температури культивування, рН середовища, швидкість аерації. Середовище для культивування має містити компоненти, які

обумовлюють спрямований синтез ліпази, тобто речовини, які містять відповідний вуглець, азот, кисень і мінеральні речовини. (Борисенко А. В. та ін., 2011)

Очікується, що до 2025 р. міжнародний ринок ліпази перевищить 797,7 млн доларів США, зростаючи з середньорічним темпом збільшення на 6,2% з 2017 по 2025 рік. Нещодавнім проривом у сфері дослідження ліпази стало створення нових і оновлених версій ліполітичних ферментів за допомогою молекулярних стратегій. Наприклад, інтеграція раціонального дизайну ферментів та спрямована еволюція ферментів для досягнення потрібних властивостей ліпаз. (Samar та ін., 2020)

Таким чином, **актуальність роботи** обумовлюється широкому використанню ліпази в косметології, оскільки є дуже ефективними у догляді за шкірою, забезпечуючи глибоке очищення пор, сприяючи розщепленню шкірного сала. Сучасні споживачі віддають перевагу косметичним продуктам з натуральними компонентами, особливо тим, які походять з біотехнологічних джерел, оскільки саме біосинтез дозволяє створити екологічно безпечні та ефективні компоненти.

Інноваційний потенціал біотехнології, а саме використання генно-інженерних підходів, дозволяє покращувати властивості ліпази, підвищувати її стабільність та ефективність у косметичних формулах. Це створює можливості для виробництва інноваційних косметичних засобів, які задовольняють сучасні вимоги до якості та безпечності.

Саме тому, існує потреба пошуку високоактивних продуцентів, які здатні на простих середовищах виробляти максимальний вихід ферменту з високою активністю, а також технології його виділення та очищення, для отримання в результаті ензиму з бажаними властивостями.

Новизною кваліфікаційної роботи є удосконалена технологія виділення та очищення позаклітинного ферменту ліпази з грибів *Rhizopus sp.* 2000 ФМ, з отриманням готового напівпродукту (високоочищеного порошку ліпази) для косметичних засобів.

У роботі також розроблено технологію отримання нового очищувального гелю з ліпазою у складі, який добре очищує шкіру обличчя, заспокоює її, не подразнює.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1

ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОБНИХ ФЕРМЕНТІВ У КОСМЕТОЛОГІЇ

Ферменти для косметичних засобів є дуже важливими про що свідчить постійне збільшення їх застосування в даній галузі. Вони використовуються як у звичайних кремах, гелях, скрабах, шампунях, так і у фарбах для волосся, зубних пастах, рідинах для полоскання рота, лаках для нігтів та навіть в вигляді ін'єкційних препаратів.

Супероксиддисмутаза (SOD) та пероксидаза (каталаза, глутатіонпероксидаза, лактопероксидаза) працюють синергічно як ексфоліант. Вони служать поглиначами вільних радикалів та оберігають шкіру від ультрафіолетового випромінювання, запобігають їй пошкодженню, спричиненого забрудненням води і повітря, мікробами та іншими різними шкідливими чинниками. Другий схожий ензим лактатдегідрогеназа (LDH), здатний стимулювати відновлення НАДФ і пірувату, що сприяє утворенню НАД⁺ і лактату як кінцевого продукту. Зазначена вище реакція зменшує вплив ультрафіолету, але в присутності LDH субодиноці лишається неушкодженою в клітинах та дозволяє їй виконувати звичайне нормальне функціонування. Ранніше, *Marinomonas* sp., *Sulfolobus acidocaldarius* і декілька інших екстремофілів, такі як *Thermus thermophilus*, застосовувалися в основному для виробництва СОД та/або пероксидази. Однак, завдяки досягненням у біотехнології, генетично-інженерні молочнокислі бактерії із великою врожайністю і поліпшеною стабільністю стали сприятливішим вибором для їхнього виробництва. (Gupta P. L. та ін., 2019)

Косметичні засоби протеолітичних ензимів дуже важливі для очищенні шкіри, гідратації і відновленні шкірного бар'єру у комбінації із усуненням запалення ран. Застосування протеаз в засобах для догляду за шкірою призначене

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тромпак В.Ю			РОЗДІЛ 1. Застосування мікробних ферментів у косметології	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Красінько В.О					12	95
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П						

не для виключення протизапальних ендогенних білків, а для пом'якшення їхньої дії, коли це потрібно. Тому, протеолітичні ферменти здійснюють захисну роль в прямій або непрямій модифікації тканин. Тип та концентрація цього ензиму мають бути відповідними для зменшення ефектів ендогенних білків, що виробляються до індукції запальних явищ і мають негативні наслідки, коли вони надмірно активні. Тому, використання протеаз може потенційно покращити гідrataцію та відновлення шкірного бар'єру з більш терапевтичним підходом, порівняно зі звичайними засобами для догляду за шкірою. У косметиці протеази в основному використовуються для сприяння відлущування та, зрештою, збільшення поглинання води та інших косметичних інгредієнтів. (Ioannou E. & Labrou E. N., 2022) Лужні аспарагінові протеази бактеріального походження з різних лужнофільних бактеріальних джерел використовувалися для лікування таких захворювань шкіри, як ксероз (сухість шкіри), іхтіоз (луската шкіра), псоріаз (лущення шкіри та запалення). (Gupta P. L. та ін., 2019) Комерційні протеази для косметичного використання найкраще отримати за допомогою технології рекомбінантної ДНК або з альтернативних джерел. Показово, що субтилізін серинової протеази, що виробляється *Bacillus licheniformis*, є ефективним засобом для відлущування шкіри (Seki, T. та ін., 2005).

Цей мікроорганізм (*Bacillus licheniformis*) також використовувався для комерційного виробництва кератинази (Gupta. P.L. та ін., 2019), яка може бути використана на розтяжках і шрамах і допомагає регенерувати епітеліальні клітини шляхом прискорення загоєння. Кератиназа діє селективно, розщеплює важкорозчинні склеропротеїни ороговілого епітелію шкіри, м'який ексfolіюючий ефект послаблює зчеплення корнеоцитів, забезпечуючи трансепідермальну доставку активних компонентів у глибокі шари шкіри. Зазвичай гідролізати кератину використовуються в шкірних мазях і кремах для п'ят, колін або ліктів, які забезпечують зовнішню гладкість і зменшують пошкодження шкіри. (Gupta P. L. та ін., 2019)

Кератинази також використовують для лікування акне. Це пояснюється тим, що прищі викликаються закупоркою сальних залоз у присутності великої

кількості кератину, який розщеплюється якраз таки кератиназою. Також даний фермент природною альтернативою використанню кислот для видалення мозолів і натоптишів. (Vidmar V. & Vodovnik M., 2018). Кератиназа також використовується в лікуванні ензимним пілінгом, для видалення волосся та затримки росту волосся. (Gupta P. L. та ін., 2019)

Широко використовуваними ферментами в зубній пасті та рідині для полоскання рота є ендоглікозидаза та папаїн, які використовуються для відбілювання зубів, видалення зубного нальоту та видалення відкладень, що викликають запах, на зубах і тканинах ясен. (Singh R та ін., 2016)

Ліпази – це надактивні ферменти, які здатні розщеплювати жири (тригліцериди), і в складі косметичних засобів виконувати дві надважливі функції: жироспалюючу та очищуючу. Потрапляючи в глибокі шари епідермісу та дерми, ліпаза пригнічує утворення нових адипоцитів і, таким чином, запобігає «розростанню» жирової тканини. Це дозволяє використовувати ліпазу в якості активного інгредієнта формул кремів і гелів, спрямованих на боротьбу з целюлітом, а також для покращення структури шкіри.

Активні мікробні ліпази здебільшого містяться в косметичних засобах для зовнішнього поверхневого очищення шкіри, де вони відповідають за м'яке розм'якшення та усунення бруду або маленьких лусочок мертвої ороговілої шкіри (тобто пілінг). Також дані ензими, часто в поєднанні з іншими ферментами, такими як, наприклад, протеази, здатні підтримувати загальне схуднення тіла, тому що розщеплюють жирові відкладення в організмі. Також їх використання було описано для очищення шкіри носа, косметичних масок для макіяжу і догляду за волоссям. (Sunar K. та ін., 2016)

Фермент гіалуронідаза — це мукополісахарид-гідролізуючий фермент, який має здатність розщеплювати гіалуронову кислоту, а також хондроїтин сульфат, хондроїтин, дерматансульфат, тому широко використовуються в косметології. В основному викликає деградацію гіалуронової кислоти (ГК), важливої малої молекули, яка заповнює простір між волокнами колагену та еластину, і допомагає підтримувати рівень вологості шкіри. Він є невід'ємною частиною позаклітинного

матриксу та відповідає за покращення гідратації, що покращує вигляд тонких ліній і зморшок. Інгібування ферменту гіалуронідази (HAase) є потужним щодо регулюючих агентів, які важливі для підтримки балансу між катаболізмом і анаболізмом гіалуронової кислоти. (Mohamed E. M., та ін., 2020)

Лігнінолітичні ферменти є новими потенційними кандидатами в відбілюючій косметиці через їх високий потенціал знебарвлення меланіну. Лігнінпероксидаза займає особливе місце в дерматології та косметології серед лігнінолітичних ферментів завдяки своєму порівняно високому окислювально-відновному потенціалу порівняно з іншими ферментами. Дослідження свідчать про високу продуктивність застосування лігнінпероксидази у косметичному секторі, де він може замінити гідрохінон та інші освітлювачі шкіри, безпека яких викликає суперечки. Крім того, розлади пігментації, такі як гіперпігментація, можна лікувати стійким способом, використовуючи такі підходи на основі ферментів. (Liu L. та ін. 2021)

Лакказа, оксидази, пероксидази та поліфенолоксидази використовуються для фарбування волосся, оскільки каталізують окиснення широкого спектру фенольних і нефенольних ароматичних сполук; каталаза, папаїн, бромелайн і субтилізин для догляду за шкірою; протеїн-дисульфід-ізомераза, глутатіон-сульфгідрил-оксидаза та трансглутаміназа у завивці волосся. Крім того, ферменти також використовуються в засобах для чищення контактних лінз для видалення білкових плівок. (Singh R та ін., 2016)

Таблиця 1.1.1.

Застосування мікробних ферментів для косметології

Назва ферменту	Для чого	У якому виді	Література
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Супероксид-дисмутаза, пероксидаза	Служать поглиначами вільних радикалів і захищають шкіру від ультрафіолетового світла	Сироватка, крем	Gupta P. L. та ін., 2019

Лактатдегідрогеназа	Поліпшує клітинний метаболізм, тим самим бореться з гіперпігментацією, сприяє регенерації шкіри та знижує рівень оксидативного стресу	Сироватка, крем-коректор	Gupta P. L. та ін., 2019
Протеаза	Очищує шкіру, збільшує гідратацію та відновлення шкірного бар'єру в поєднанні з усуненням запалення ран	Очисні гелі, пінки, сироватка, крем, маска	Ioannou E. & Labrou E. N., 2022
Кератиназа	М'яко видаляє мертві клітини шкіри та поліпшує загальний вигляд шкіри та волосся; допомагає в лікуванні акне, оскільки запобігає закупорці пор	Гелі та пінки, міцелярна вода, скраб, сироватка, шампуні, кондиціонер и	Gupta P. L. та ін., 2019 Vidmar B. & Vodovnik M., 2018
Ендоглікозидаза	Відбілювання зубів, видалення зубного нальоту та видалення відкладень, що викликають запах, на зубах і тканинах ясен	Зубні пасти, ополіскувачі для рота	Singh R та ін., 2016
Ліпаза	Очищення шкіри, регуляція шкірного сала, антицелюлітний ефект, оскільки дуже добре розщеплює жири	Гелі та пінки, ензимні пілінги, скраби, маски, сироватки, креми.	Sunar K. та ін., 2016
Гіалуронідаза	Викликає деградацію гіалуронової кислоти (ГК), і допомагає підтримувати рівень вологості шкіри; покращує вигляд тонких ліній і зморшок	Креми, лосьйони, постін'єкційні гелі	Mohamed E. M., та ін., 2020
Лігнінпероксидаза	Застосовується у відбілюючій косметиці через його високий потенціал знебарвлення меланіну	Креми	Liu L. та ін., 2021

Лакказа, оксидаза, поліфенолоксидаза	Каталізують окиснення широкого спектру фенольних і нефенольних ароматичних сполук, тому застосовують при фарбуванні волосся	Фарби для волосся, окислювачі	Singh R та ін., 2016
Каталаза, папаїн, бромелайн, субтилізин	Для боротьби з віковими змінами шкіри; зменшує появу пігментації та зморшок	Креми, маски	Singh R та ін., 2016
протеїн-дисульфід-ізомераза, глутатіон-сульфгідрил-оксидаза, трансглутаміназа	Впливають на структуру волосся, роблячийого більш гнучким і формованим, тому використовують у завивці волосся.	Засіб для завивки (крем або розчин)	Singh R та ін., 2016

1.1. Переваги мікробних ферментів для косметології над рослинними і тваринними

Ферменти синтезуються дуже багатьма мікроорганізмами і вищими еукаріотами, однак все ж таки більшість корисних ензимів мають мікробне походження. У загальному промисловому виробництві ферментів переважно домінують ензими, отриманні з мікроб, адже 50% виробляється грибами та дріжджами, а 35% — бактеріями, тоді як 15% — із рослин. (Jayakumar P. та ін., 2019)

Перш за все це пов'язано із тим, що мікробні ферменти мають більшу активність, ніж відповідні їм рослинні та тваринні, а це є дуже важливим. (Veeraragu M. та ін, 2013). Так, наприклад, мікроорганізми *Bacillus sphaericus* культивували за температури 30°C при 300 об/хв з використанням глюкози як джерела вуглецю та біопептону як джерела азоту у ферментері на 7 л, рН 10. Активність ферменту протеази досягалася аж 68000 Од/мл після 30 годин вирощування, що є надзвичайно великою. (Gonçalves dos Santos Aguilar G & Harumi Sato H., 2018)

Одержані біотехнологічним шляхом ензими мають гарні характеристики та добре працюють у широкому діапазоні різноманітних фізичних і хімічних умов, тобто є більш стабільними порівняно з одержанням їх із рослин і тварин. (Singh R та ін., 2016) Так, вчені (Kumar Sethi B., 2016) встановили, що ліпаза, одержана за допомогою грибів *A. terreus* NCFT 4269.10, є стабільно активною в діапазоні рН від 6,0 до 9,0, в діапазоні температур від 30 до 80°C та є високостабільною при 60°C протягом 1 год, тобто характеризується високою термостабільністю.

Дослідження також показують, що ліпаза, одержана за допомогою *Pseudomonas fluorescens*, була іммобілізована на смолі Дауекс MWA-1 та зберегла 73 % активності після 160 годин роботи при 60 °C в концентрованому субстраті. (Некрасов П.О. та ін, 2011)

Вченими встановлено, що термофільні гриби здатні продукувати також протеази з високою термостабільністю та оптимальною активність при більш високих температурах. (Souza P. та ін., 2015) Так, наприклад, протеазу *T. aurantiacus* виробляли в системі SSF, що містить пшеничні висівки, при 60 °C, при цьому фермент зберігав максимальну активність (Merheb C. W. та ін, 2007). Подібні результати щодо оптимальної активності при підвищених температурах показали протеази термофільних грибів *Thermomyces lanuginosus* (70, 50 і 45 °C) (Macchione M. M. та ін., 2008) і *Thermomucor indicae-seudaticae* (70 °C) (Merheb-Dini C. та ін., 2010).

З літературних даних щодо термостабільних ліпаз найбільшою питомою активністю володіє ліпаза BTL2 з штаму *Geobacillus thermocalenulatus* DSM 730, температурний оптимум специфічної активності якої лежить в діапазоні 60 - 75°C. Ліпаза також відрізняється високою стабільністю в присутності детергентів (крім SDS) і органічних розчинників (метанол, ацетон, ізопропанол). (Kambourova M. та ін., 2018)

Мікробні ферменти, на відміну від рослинних і тваринних, також мають широкий діапазон активності рН. Так, наприклад, вченими було показано, що лужна протеаза, виділена з *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528, є оптимально активною при рН 10 (Kuddus, M. & Ramteke, P.W., 2011). Протеаза,

що продукується *Pseudoalteromonas* sp. NJ276 має оптимальну ферментну активність при рН 8,0. Приблизно 31 і 38% його оптимальної активності виявляється при рН 5,0 і 11,0 відповідно. (Baghel V.S. та ін., 2015) Протеаза *Pseudomonas* sp. штам DY-A продемонстрував широкий профіль рН (рН 6,0–12,0) для гідролізу та найвищу активність між рН 8,0 і 10,0. Найвища стабільність цієї протеази зафіксована при рН 10,0. (Zeng, R. та ін., 2013)

А от ферменти отриманні з тварин, не мають такої стабільності. Вченими встановлено, що для багатьох ферментів ссавців 37°C і 7,4 є оптимальними температурою і рН відповідно, і їх активність дуже чутлива до будь-якої зміни цих параметрів. Більш висока температура (>40°C) і велике відхилення від фізіологічного рН (7,4) призводять до їх денатурації, що обмежує використання цих макромолекул у нефізіологічних умовах. Крім того, вони чутливі до інгібування субстратом або продуктом, і їхні продукти можуть викликати алергічні реакції. Висока вартість виділення та очищення ферментів із ссавців і їх складне відновлення для подальшого повторного використання дуже перешкоджають їх використанню. (Singh R та ін., 2016)

Ще одна перевага мікробних ферментів полягає в тому, що мікроорганізми здатні виробляти більш високі концентрації ензимів, порівняно з отриманням їх з тварин та рослин. (Adrio J. L. & Demain A. L., 2017) Дослідники (Дехтяренко Н. В. & Пєскова Л.О., 2014) зазначають, що гриби *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 за температури 30 °С протягом 3 діб на качалках зі швидкістю обертання 250 об/хв на середовищі YNB із додаванням глюкози (5 мас. %), оливкової олії (5 мас. %) і сечовини (0,8 мас. %) культивували ліпазу в кількості 9000 Од/мл.

Інші вчені також підтверджували високий вихід мікробних ферментів. Так, в дослідженні (Derhab N. та ін., 2023) спостерігали, що бактерії *Bacillus cereus* L10 при рості за температури 35°C, рН 7,0 на середовищі з використанням курячого пір'я як основного джерела та розміром інокуляту 4% протягом 5 днів синтезували кератиназу в кількості 9602 Од/мл. Також дослідники (Neifar M. та ін., 2016) встановили, що бактерії *Pseudomonas extremorientalis* BU118 на 6-й день культивування при твердофазній ферментації на пшеничних висівках за лужних

значень рН (оптимальне 8,0) та температури 40°C синтезують 6980 Од/мл ферменту лаккази.

Ферменти мікробного походження можна легко культивувати за допомогою генних маніпуляцій мікроорганізмів відповідно до промислових потреб. (Singh R та ін., 2016) Так, дослідники (Qinghua Z. та ін., 2020) встановили, що можна продукувати ферментативні ділянки гіалуронідази *Staphylococcus pyogenes* у *Escherichia coli*. Завдяки цьому властивість виробленого фермента добре зберігається, а кількість збільшується. Враховуючи низьку ефективність виробництва та патогенність видів *Staphylococcus*, кращим буде виробництво рекомбінантного ферменту.

Генетичні маніпуляцію також дуже часто проводять з мікроорганізмами для одержання ліпази для косметології. Прикладом є термостабільний штам *Yarrowia lipolytica* 2, який успішно надмірно експресували у *P. pastoris* за допомогою комбінованої стратегії. Спочатку були окремо оптимізовані дозування мутованого гену *lip 2*, а потім і параметри ферментації. Згодом гени гемоглобіну *Hac1p* і *VNб* коекспресували з *Yarrowia lipolytica* 2 для зменшення стресу ендоплазматичного ретикулуму та підвищення ефективності поглинання кисню в рекомбінантних штаммах, відповідно. Виходячи з цього, культивування на щільному поживному середовищі застосовували для отримання найвищої активності ліпази. Ці стратегії призвели до покращення рівня експресії генів *Yarrowia lipolytica* 2 у *P. pastoris* та активність мутанта збільшилась в 36,5 рази (зі 255 до 9080 Од/мл) (Qinghua Z. та ін., 2020)

Для отримання мікробних ферментів, мікроорганізми можна культивувати у великих кількостях відносно за короткий період, що є теж суттєвою перевагою у порівнянні з отриманням ферментів із рослин і тварин. (Adrio J. L. & Demain A. L., 2017). Так, наприклад штам *Serratia marcescens* B-10 L-1 культивують на качалках зі струшуванням при 28—30 °C на середовищі, г/л: $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,25; KH_2PO_4 — 3,0; $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ — 7,0; NH_4Cl — 1,0; $CaCl_2 \times 2H_2O$ — 0,02; $NaCl$ — 0,5; відвар соєвого борошна — 50,0. Вже через 10 год культивування в

культуральній рідині накопичується максимальна кількість ліпази зі специфічною активністю 800 од. акт./мг біомаси. (Дехтяренко Н. В. & Пєскова Л.О., 2014)

Мікробні ферменти також мають перевагу перед рослинними і тваринними через їх легше виділення. Так, мікробні протеази для косметології є позаклітинними за своєю природою і безпосередньо секретуються продуцентом у ферментаційний бульйон, таким чином спрощуючи подальшу обробку ферменту порівняно з протеазами, отриманими з рослин і тварин. (Souza P. та ін., 2015)

Тому мікробне виробництво ферментів для косметології економічне у великих масштабах завдяки недорогому культуральному середовищі за короткий цикл ферментації. За допомогою різних мікроорганізмів (бактерій, грибів, дріжджів) одержують недорогі, високоактивні і стабільні ензими для косметології.

РОЗДІЛ 2

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТІВ ДЛЯ КОСМЕЦЕВТИКИ

У промислових масштабах ферменти виробляють у складних середовищах, що містять глюкозу та інші субстрати. Умови культивування є важливими для успішного виробництва ферментів, тому оптимізація таких параметрів, як рН, температура та склад середовища, повинна контролюватися під час виробничого процесу. Зокрема, на виробництво ферментів в основному впливають варіації співвідношення C/N, присутність деяких цукрів, які легко метаболізуються, таких як глюкоза та іон металу, окрім кількох інших фізичних факторів, таких як аерація, щільність інокулята, рН, температура та інкубаційний час. На синтез ферментів також впливають джерела азоту, що швидко метаболізуються, такі як амінокислоти в середовищі. (Souza P. та ін., 2015)

Для покращення виробництва ферментів використовувався скринінг на наявність гіперпродукуючих штамів, клонування та надекспресія, контрольована періодична ферментація та періодична ферментація з підживленням з використанням одночасного контролю глюкози, концентрації іонів амонію, напруги кисню, рН та доступності солі, хемостатної ферментації та оптимізація середовища культивування за допомогою статистичного підходу, такого як методологія поверхні відгуку. (Souza P. та ін., 2015)

Також існують різні механізми регуляції синтезу та секреції позаклітинних ферментів. Наявність великої кількості субстрату може індукувати секрецію ферментів. Високі рівні кінцевих продуктів, таких як амінокислоти, NH_4^+ і джерела вуглецю, які легко метаболізуються також можуть пригнічувати виробництво. З іншого боку, виробництво ферментів може бути збільшено, коли доступні недостатні рівні вуглецю, азоту або сірки. Нарешті, позаклітинні ферменти можуть конститутивно секретуватися на низьких рівнях незалежно від

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 2. Біотехнологічні аспекти одержання ферментів для космецевтики	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					22	95
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						22

наявності субстрату. (Souza P. та ін., 2015)

Відомо, що на виробництво ферментів мікроорганізмами впливає також і якість джерела азоту. Незважаючи на те, що для виробництва ферментів зазвичай використовуються комплексні джерела азоту, потреба в певних добавках азоту відрізняється від організму до організму. Як правило, гриби виробляють більше ензимів на більш складних білкових джерелах азоту, ніж на низькомолекулярних або неорганічних джерелах азоту. Було також виявлено, що синтез ферментів пригнічується джерелами азоту, що швидко метаболізуються, такими як амінокислоти або концентрації іонів амонію в середовищі. (Souza P. та ін., 2015) Так, наприклад, вченими встановлено, що для синтезу ліпази мікроорганізмами дуже важливою складовою поживного середовища є соєве борошно, ліпідний комплекс якого збільшує біосинтез цього ферменту. Деякі продуценти замість соєвого борошна або разом із ним, можуть споживати кукурудзяний екстракт, пептон, соєву макуху, казеїн, кормові дріжджі, білково-вітамінний концентрат, дріжджовий автолізат, рибне борошно, молочну сироватку. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014)

Одним із ключових біотехнологічних факторів для синтезу ферментів є наявність індукторів біосинтезу. Наприклад, для отримання ліпази, яка використовується в косметології, за участю мікроорганізмів, процес культивування є індукційним, тому в середовище часто дають ліпідні компоненти. Дослідники відзначають, що концентрація ліпідів у середовищі не повинна перевищувати 10–50% від загальної кількості джерел вуглецю, або 5–20 г/л. Збільшення цієї норми може призвести до зниження синтезу ферменту, що, ймовірно, зумовлено накопиченням продуктів розщеплення ліпідів, які пригнічують біосинтез ліпази. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014)

У роботі (Шеламова С. А., 2012) пропонується використовувати неіоногенні поверхнево-активні речовини (ПАР), такі як, наприклад, твіни, спани та жовті кислоти (аніони ПАР), в якості джерела вуглецю як стимулятори біосинтезу. Так, вплив різних ПАР на синтез ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 досліджували в середовищі з соєвим шротом (2%), кукурудзяним екстрактом (1%), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

(0,5%) і соняшниковою олією (0,5%). Дослідження показали, що полівініловий спирт і фосфатний концентрат незначно впливають на синтез ліпази в мікроміцеті. Негативний вплив мали бридж 35 (поліоксиетиленлауриновий ефір) і бридж 58 (поліоксиетилен-20-цетиловий ефір). Додавання тритону X-305 сприяло росту, а тому і збільшенню активності ферменту в 3,25 рази.

У літературі також є результати, що включення ліпідів у живильне середовище не стимулює біосинтез ліпази, а навіть пригнічує його. Наприклад, біосинтез ліпази з *Penicillium roqueforti* був інгібований маслом, кукурудзяною та оливковою олією. (Dobrev G. та ін., 2015)

2.1. Продуценти ферментів для космеології

Серед багатьох мікроорганізмів знайдено активних продуцентів ферментів, зокрема, це бактерії роду *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Geobacillus*, *Serratia*, а також актиноміцети — *Streptomyces flavogriseus* і *Thermoactinomyces vulgaris*. За даними літератури, ефективними продуцентами ферментів є також дріжджові культури роду *Candida* (наприклад, *Candida lipolytica*, *Candida cylindraceae*, *Candida paralipolytica*), *Yarrowia*, *Pichia Rhodotorula*, *Torulospora*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014)

Зазвичай бактерії накопичують внутрішньоклітинні ферменти, тоді як актиноміцети, гриби та дріжджі продукують переважно позаклітинні. Ензими, отримані з мікробних джерел, відрізняються широким спектром фізико-хімічних і біологічних характеристик. Для виробництва ферментів із бактерій та грибків потрібен індивідуальний контроль різних параметрів, таких як температура, рН і відповідний субстрат. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014)

Нитчасті гриби використовуються в багатьох промислових процесах для виробництва ферментів. Серед багатьох переваг виробництва ферментів грибами є низькі витрати на матеріал у поєднанні з високою продуктивністю, швидшим виробництвом і легкістю, з якою ферменти можна модифікувати. Крім того, ферменти, будучи зазвичай позаклітинними, легко вилучаються із середовища. Виробництво ферментів грибкового походження має перевагу перед

бактеріальними, оскільки міцелій можна легко видалити шляхом фільтрації. Крім того, використання грибів як продуцентів ферментів безпечніше, ніж використання бактерій, оскільки вони зазвичай визнаються GRAS (загалом вважаються безпечними). (Souza P. та ін., 2015)

Проаналізувавши літературу останніх років, серед основних косметичних ферментів, які виробляються грибами та дріжджами є ліпаза, протеаза, лакказ, кератиназа. Так, ліпазу можуть виробляти мікроорганізми *Aspergillus terreus* NCFT 4269 при твердофазному бродінні за температури 30°C з джерелом Карбону – пальмовою олією. Через 96 годин спостерігається максимальний вихід продукту – 366 Од/мл. (Kumar Sethi B. та ін., 2016) Інші види грибів також здатні продукувати ліпазу для косметології. *Rhizopus sp.* 2000 ФМ при глибинній ферментації в колбах на качалках зі швидкістю обертання 160 об/хв, при температурі 40 - 42°C з оптимальним об'ємом поживного середовища 150 мл + 5% інокуляту продукував 437,7 Од/мл ліпази. (Борисенко А. В. та ін., 2011)

Гриби *Aspergillus foetidus* здатні продукувати протеазу для косметології. Так, при їх вирощуванні в колбах на качалках зі швидкістю обертання 150 об/хв за температури 28°C, рН 7,0 через 168 годин спостерігався найкращий вихід ферменту – 248,1 Од/мл. (Souza P. M. та ін., 2016)

Також гриби *Marasmiellus palmivorus* LA1 продукують лакказу для косметичної промисловості. Так, при вирощуванні їх за температури 28°C, рН 5, з використанням галактози в якості джерела вуглецю та концентрацією інокуляту 6 %, вчені спостерігали максимальне накопичення ферменту – 6674 Од/мл. (Chenthamarakshan A. та ін., 2017) Інші гриби також здатні виробляти лакказу. Так, *Trametes velutina* 5930 за участі індукторів, таких як Cu^{2+} та сиригової кислоти в середовищі, після 13 днів вирощування накопичував максимальний вихід лаккази - 6630 Од/мл. (Yang Y. та ін., 2013)

Гриби *Cochliobolus hawaiiensis* AUMC 8606 здатні продукувати кератиназу для космецевтики. Так, при вирощуванні їх під час твердофазної ферментації, з використанням курячого пір'я, зволоженого сольовим розчином, як поживного середовища та додаванням глюкози, яке підтримувало максимальне виробництво

ферменту; за температури 30°C і початковому рН 9,5 та вмісті вологи 82%. Через 15 днів ферментації спостерігалось накопичення продукту у кількості 433,4 Од/мл. (Isaac G. S. & Abu-Tahon M. A., 2016).

В свою чергу бактеріальне вироблення ферментів для косметології теж має ряд переваг. Перш за все це висока швидкість росту, тобто бактерії здатні швидко розмножуватись, що дозволяє оперативно отримувати великі об'єми ферментів. Інша перевага ензимів бактеріального походження – широкий спектр умов вирощування. Бактерії можуть рости в різних умовах – від аеробних до анаеробних, від високих до низьких температур, що дозволяє підібрати оптимальні умови для виробництва конкретного ферменту. Також бактерії можуть синтезувати ферменти у великій кількості, що підвищує загальну ефективність процесу. А ще виробничі процеси за участі бактерій легко масштабуються з лабораторного рівня до промислового, що також є суттєвою перевагою.

Проаналізувавши літературу останніх років, серед основних косметичних ферментів, які виробляються бактеріями є ліпаза, протеаза, лакказа, кератиназа, гіалуронідаза. Так, бактерії *Brevibacillus laterosporus* на середовищі, що містить пептон як єдине джерело вуглецю та неорганічного азоту, за температури 37°C, рН 7,0 та за перемішування 180 об/хв через 48 год продукує максимальну активність ферменту – 2000 Од/мл. (Anbu. P., 2016) Бактерії *Bacillus licheniformis* LBA 46 за глибинного культивування, при температурі 30°C, рН 7,0 та за перемішування 200 об/хв через 96 год культивування накопичують позаклітинну ліпазу в кількості 4000 Од/мл. (Contesini F. J., 2017)

Ліпазу для косметології також здатні виробляти бактерії. Так, *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 при температурі 45°C; рН 7,0 з використанням пептону як джерела азоту та сахарози як джерела вуглецю здатні виробляти даний фермент у кількості 99,9 Од/мл. Слід зазначити, що йони Ca²⁺ та Mg²⁺ визнані при цьому найкращими стимуляторами при виробництві ліпази, а також покращують синтез даного ферменту твін 20 і 80. (Haniya M. та ін., 2017)

Бактерії також здатні утворювати лакказу для косметології. Так, *Alcaligenes faecalis* XF1 культивували при температурі 37°C глибинним способом, в присутності індукторів CuSO_4 та гваяколу. Через 48 годин спостерігався максимальний вихід продукту – 110 Од/мл. (Seema M. та ін., 2020)

Є дослідження також про виробництво кератинази бактеріями. Так, *Bacillus cereus* YQ15 культивували глибинним способом за температури 35°C та за перемішування 160 об/хв протягом 36 год. Вихід даного ферменту становив – 925 Од/мл. (Rong-Xian Z. та ін., 2022)

Гіалуронідазу для косметології також здатні синтезувати бактерії. Так, *Bacillus* sp. A50 за глибинного культивування при температурі 44°C та pH 6,5 накопичував даний фермент в кількості 1500 Од/мл. Слід також зазначити, що активність гіалуронідази збільшувалась за допомогою іонів Ca^{2+} , Mg^{2+} або Ni^{2+} та пригнічувалась Zn^{2+} та Cu^{2+} . (Хуеріng G. та ін., 2014)

2.2. Способи культивування мікроорганізмів для одержання ферментів для косметології

Ферменти можна отримувати зануреним (SmF) і твердофазним бродінням (SSF), і кожна техніка має особливі переваги, з якими інші не можуть зрівнятися.

Метод SSF має ряд переваг в порівнянні з традиційним SmF, зокрема: низькі виробничі витрати, використання недорогої сировини як субстратів, зменшене споживання енергії, а також спрощену подальшу обробку продукту. Крім того, продукти SSF більш стабільні за рахунок нижчого рівня розведення в середовищі, що дозволяє досягти вищої продуктивності. В свою чергу, SmF забезпечує зручність контролю та полегшує вилучення позаклітинних ферментів, міцелію або спор, хоча продукти в цьому випадку є більш розбавленими, а ферментні екстракти — менш стійкими в порівнянні з першим методом (Souza P. та ін., 2015)

За оцінками, з промислової точки зору близько 30–40% вартості виробництва ензимів припадає на вартість поживного середовища для зростання мікроорганізму. Тому, процеси твердофазної ферментації (SSF) створюють особливу економічну вигоду для країн, що мають великий обсяг біомаси і відходів агропромислового виробництва, адже їх можна застосовувати як дешеву

сировину. Крім цього, в останні роки, велика увага також приділяється утилізації твердих відходів, таких як, наприклад: борошно з пир'я та кукурудзяний розчин, білкові тверді відходи шкіряного виробництва; білковий порошок панцирів креветок; порошок сардинелли (*Sardinella aurita*) і відходи панцирів криветок для синтезу ензимів. (Vijayaraghavan P. та ін., 2014)

У великомасштабному виробництві методом твердофазної ферментації для вирощування грибів основними викликами є обмежене відведення тепла і води. Водночас за глибинного культивування вода присутня в достатніх кількостях, що забезпечує стабільні умови для температури, концентрації кисню та поживних речовин. Мала кількість води в SSF дозволяє підтримувати метаболіти у більш концентрованому вигляді, полегшуючи й здешевлюючи подальшу обробку. Однак особливі умови SSF, зокрема низький рівень вологи, мають свої переваги для виробництва грибкових ферментів. По-перше, вони сприяють зростанню нитчастих грибів, які природним чином розвиваються на твердих субстратах, таких як дерева, листя, коріння рослин та інші органічні матеріали. По-друге, низька вологість зменшує ризик бактеріальної контамінації під час ферментації. І нарешті, умови SSF можуть стимулювати мікроорганізм виробляти ензими із властивостями, відмінними від тих, що продукуються в умовах заглибленого синтезу. (Souza P. та ін., 2015)

За допомогою твердофазної ферментації можна отримати протеазу для косметології. Вченими (Vijayaraghavan P. та ін., 2014) досліджено, що *B. cereus* AT за допомогою SSF продукує доволі велику кількість ферменту. Так, в якості субстрату для виробництва лужної протеази використовували шкірку яблук, бананів, коров'ячий гній, рисову солому і пшеничні висівки. Усі субстрати сушили (сушили на сонці) протягом кількох днів і далі сушили при 60 °C протягом 1 години. SSF проводили окремо в колбі Ерленмейєра об'ємом 250 мл, що містила 10 г коров'ячого гною, а інші субстрати зволожували 10 мл буфера (трис-НСІ буфер, 0,1 моль л⁻¹, рН 8). Середовище стерилізували при 121 °C протягом 20 хв. Після охолодження колби засівали 5% (об./мас.) інокулятом (*B. cereus* AT) та інкубували при 37 °C протягом різних періодів часу (12, 24, 36, 48,

60, 72, 84 та 96 год). Найкращий вихід спостерігався при використанні коров'ячого гною як субстрату протягом 72 год культивування (4813 Од/мл).

Також за допомогою твердофазної ферментації можна отримати кератиназу для косметології. Так, показано, що бактерії *Paenibacillus woosongensis* ТКВ2 за допомогою SSF з використанням 0,75% сирого курячого пір'я як єдине джерело вуглецю й азоту, за температури 30°C та рН 5,8 і використанням 2% інокуляту, продукували максимальний вихід кератинази – 6520 Од/мл. (Tanmay P. та ін., 2013)

Лакказу для косметології також можна отримати за допомогою поверхового культивування. Вченим досліджено, що бактерії *Pseudomonas extremorientalis* за допомогою SSF здатні утворювати велику кількість лаккази. Так, пшеничні висівки, використовували як твердий субстрат для виробництва лаккази відібраним гіперсекреторним штамом. П'ять грамів субстрату переносили в конічні колби об'ємом 100 мл, а потім зволожували 10 мл середовища триптичного соєвого бульйону (TSB). Початковий рН середовища встановлювали на рівні 8. Колби автоклавували при 121 °C протягом 15 хвилин та інокулювали 0,1 мл 1,0 % об'єму (OD 600 нм \approx 1,20) інокулята з материнської рідкої культури *Pseudomonas extremorientalis*. Після інкубації одержували вихід фермента 6980 Од/мл. (Neifar M. та ін., 2016)

Серед переваг глибинного способу культивування є вища продуктивність, оскільки SmF дозволяє значно збільшити обсяг виробництва ферментів, так як в процесі задіяні великі об'єми рідини, що забезпечує можливість масштабного виробництва. За допомогою даного методу легше контролювати параметри культивування, такі як температура, рН, аерація та концентрація поживних речовин, а саме це забезпечує стабільні та оптимальні умови для росту мікроорганізмів і вироблення ферментів. Глибинний спосіб дозволяє краще контролювати стерильність процесу, що знижує ризик контамінації культури сторонніми мікроорганізмами. SmF легко автоматизувати, що зменшує потреби у великій кількості ручної праці та підвищує ефективність виробничого процесу, а це є більш економічно вигідним. Тому, глибинний метод культивування

ферментів є більш ефективним, гнучким, економічно вигідним порівняно з іншими.

За допомогою глибинного культивування, можна отримати протеазу для косметології. Так, *Bacillus subtilis* за температури 45°C, рН 10,0 при безперервному перемішуванні (180 об/хв) з використанням галактози та пептону, як джерела вуглецю та азоту відповідно, через 36 год накопичували максимальний вихід протеази – 475,56 Од/мл. (Gaurav P. та ін., 2015)

Інші бактерії за допомогою глибинного методу здатні синтезувати гіалуронідазу для косметології. Так, *Bacillus* sp. LA_04 при зануреному культивуванні за температури 37°C, рН 6,5 з використанням 1% NaCl, 0,5% дріжджового екстракту, 0,2% хлорид амонію, 400 мкг/мл гіалуронової кислоти, протягом 48год інкубації продукували 4326 Од/мл гіалуронідази. (Abed L. та ін., 2013)

Гриби *Aspergillus niger* CNMN FD 01L здатні продукувати ліпазу для косметології за допомогою SmF. Так, при глибинному культивуванні за температури 28°C в колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл на качалці (180 – 200 об/хв) на середовищі з соєвою мукою як головне джерело вуглецю та нітрогену, об'єм інокуляту 10% дані гриби продукували ліпазу з активністю 1731 Од/мл. (Десятник А. А. та ін., 2010)

2.3. Виділення та очищення ферментів для косметичних засобів

Процес виділення та очищення ферментів є дуже важливим, складним і трудомістким. Для застосування ензимів у косметології необхідно забезпечити їх високу чистоту. Технологія виробництва порошку ліпази складається з двох основних етапів:

- Виділення ензиму із культуральної рідини та його первинне концентрування і осадження;
- Очищення виділеного ензиму хроматографічними методами, сушіння білка.

Ферменти у високоочищеному і гомогенізованому стані отримані із великої кількості мікроорганізмів, причому їх ступінь очищення в 20–960 разів

вища в порівнянні з вихідною культурою. Рівень активності таких препаратів також змінюється і може становити від десятих часток відсотка до 32%. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л. О., 2014)

Після видалення біомаси та нерозчинних часток шляхом фільтрування або центрифугування супернатант концентрують за допомогою ультрафільтрації, екстракцією органічними розчинниками або осадженням. Приблизно 80% усіх методів очищення включають стадію осадження. Використано 60% процедур очищення сульфат амонію, тоді як 35% використовували етанол, ацетон або кислота (зазвичай соляна кислота) для осадження фермент. У простих процесах очищення етап осадження зазвичай виконується на ранніх стадіях відновлення з наступним хроматографічним розділенням. Методи осадження зазвичай мають високий вихід (87%) порівняно з методами хроматографії, які призводять до нижчого виходу близько 60–70%, однак хроматографія забезпечує утворення більш високоочищеного ензиму. (Chung H. T та ін., 2015).

Серед методів очищення ферментів, хроматографія на колонках виявилася найбільш ефективною. Незалежно від того, за яким принципом розділяються білки — адсорбція, іонний обмін, афінна хроматографія або молекулярне сито, — методика залишається майже однаковою. Процедура починається з нанесення розчину ферменту (в буферному середовищі) на колонку, попередньо збалансовану цим же розчинником. Далі через колонку пропускають буферний розчин або вибір елюента у зростаючій концентрації, градієнтну елюцію або ліганд, специфічний для необхідного ензиму. Елюат збирають у фракціях, а в кожній з них оцінюють ліполітичну активність і вміст ферменту (Patel A. K. та ін., 2023)

За даними (Saxena R. K. та ін., 2013), адсорбційна хроматографія застосовується в 16 % проаналізованих схем очищення, іонообмінна хроматографія використовується в 67%, при чому у 29% випадків застосовується в технології більше одного разу. Гель-фільтрація реалізується в 60 % схем очищення ліпази і в 22 % схем більше одного разу. Афінна хроматографія впроваджується як стадія очистки у 27 % проаналізованих у праць.

Одним з найновіших методів очистки ліпази є використання водних двофазових систем. Поділ на фази є загальним явищем, що проходить, коли поєднуються два розчини водорозчинних полімерів або полімер і розчин солі. Так, наприклад, було створено схему очистки ліпази *Mucor miehei* із застосуванням поліетиленгліколю (ПЕГ) та натрій фосфату. Кращими параметрами для максимального виходу відновленої ліпази були низька молекулярна маса полімеру (ПЕГ 400), високий рівень рН — вище ізоелектричної точки ліпази (рН 8,5) — і додавання NaCl у концентрації 0,5 М. Даний ензим очищали в 2 етапи: на початку екстрагували у верхню фазу системи (3,3 % ПЕГ 6000, 15 % натрій фосфату, 1,9 % натрій хлориду, рН 3,4), потім у нижню фазу додаванням 7 % натрій фосфату, 1 % натрій хлориду, 42 % води, рН 6,3. (Patel A. K. та ін., 2023) Ця двоетапна процедура наразі виконується у 69% методах очищення ліпази, забезпечуючи вихід ферменту понад 80%. (Saxena R. K. та ін., 2013)

Метод водної двофазної флотації був також використаний для екстракції ліпази *Burkholderia serapia* безпосередньо з культурального бульйону за один етап переробки. За оптимізованих умов ця система складалася з 40% (мас./мас.) сирі сировини, 30 мл/хв швидкість потоку азоту при 60 хв часу флотації і рН 6. Щоб викликати термосепарацію, фазу ЕОРО видаляли від первинної екстракції та занурюють у 65°C водяній бані 15 хвилин. В результаті було досягнуто очищення в 17,75 разів і відновлення білка на 98,22% (Chung H. T та ін., 2015).

Виявлено, що мембранні процеси все більше беруть участь у очищенні різних біомолекул. Так, наприклад, вчені (Yagmurcu E. R та ін., 2017) очистили ліпазу *Staphylococcus carnosus* за допомогою двох стратегій очищення, перша стратегія включала використання сартобінд-феніл мембрани, а другий підхід ґрунтувався на сильних катіонах. Прототип змішаного режиму теплообмінника СЕХ, який поєднує електростатику (групи сульфанової кислоти) з НІСs. Для першої стратегії мембранних процесів, оптимальні умови для специфічного зв'язування ліпази з клітини спостерігалися при рН 7,0 з 0,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Вихід становив 89%, залишкова активність 92% і коефіцієнт очищення 3,2. Для

прототипу мембрани СЕХ змішаного режиму, оптимальне зв'язування спостерігалось при рН 5,0, вихід становила 93% ліпази, а залишкова активність становила 98%, коефіцієнт очищення 7,8.

Для виділення та очистки мембранозв'язаної структури ліпази використовують афінну хроматографію на груповому біоспецифічному сорбенті, який іммобілізований на гранульованому поліамідкефаліні. Даний метод дає змогу одержати гомогенну ліпазу. Так, наприклад, японська фірма “Тойокодьо” запатентувала техніку очищення ліпази із застосуванням сорбентів у вигляді солей вищих жирних кислот, що утворюються у вигляді гранул або мікрокапсул. Ензим сорбується в них, а далі елююється ПАР. Даний метод дає можливість отримати високоочищені препарати ліпази з активністю до 90—95 % від вихідної. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014)

Більшість методів очищення ліпази, описаних в літературі, орієнтовані на очищення невеликих кількостей ферменту до високої чистоти. Водночас про широкомасштабні комерційні методи очищення ліпази опубліковано мало інформації. Для деяких комерційних продуктів ліпази високий рівень чистоти не є обов'язковим, оскільки він призводить до збільшення витрат і знижує загальне відновлення ферменту.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА
РОЗДІЛ 3
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Характеристика ліпази

На сьогодні більшість промислово важливих ферментів на світовому ринку складають гідролази серед яких виділяється ліпаза, що знаходить застосування в косметичній галузі. Ліполітичні ферменти зустрічаються в організмах різних рівнів біологічної організації проте найбільш ефективним є виробництво ліпаз мікробного походження.

Ліпаза (ЕС3.1.1.3) – це фермент, який розщеплює жири (ліпіди) на більш прості складові частини: жирні кислоти та гліцерин. Вона належить до класу гідролаз і також відома як жиророзщеплювач, гідролаза складного ефіру гліцерину або триацилгліцерол гідроліз тригліцеридів.

Ліпази є всюдисущими ензимом, що відноситься до суперсімейства складчастих α/β гідролаз і мають мережу водневих зв'язків у своєму активному центрі, що містить тріаду Ser, Asp (Glu) та His. Дані ферменти є субстратно-специфічними і володіють такими властивостями, як хемо-, регіон-, стереоспецифічність і здатність каталізувати гетерогенні реакції як у водорозчинних, так і у водонерозчинних системах. (Javed S. та ін., 2018)

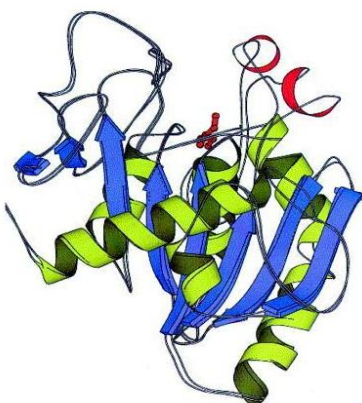


Рис. 3.1.1. Кристалічна структура ліпази *Thermomyces lanuginosus* (Akshita M. та ін., 2017)

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
		Тромпак В.Ю			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
		Красінько В.О					34	95
						Кафедра БТМ		
		Стабніков В.П				34		

Ліпази отримані із різних мікроорганізмів мають і інакші фізико-хімічні властивості. Дані ферменти не передбачають кофактора для своєї активності і лишаються активними в органічних розчинниках. Велика частина бактеріальних ліпаз, за винятком *Halobacillus sp.* LY5 та *Pseudomonas gessardii* 212 мають молярну масу менше 70 кДа. Мінімальна молярна маса 19 та 19,2 кДа спостерігалася для ліпаз з *Bacillus stratospericus* і *Enterococcus faecium* відповідно. (Javed S. та ін., 2018)

Ліпази активні в широкому діапазоні рН і температур. Вони є стабільними в межах рН від 4,0 до 11,0 і температурними оптимумами в межах від 10 до 96°C. (Akshita M. та ін., 2017) Ліпази, одержані з *Pseudomonas gessardii*, *Bacillus pumilus* RK31, *Spirulina platensis* інтенсивно функціонують при кислому рН, в той час як багато інших ліпаз бактерій працюють за лужного рН. Ліпаза *Cohnella sp.* A01 проявляє найбільшу активність при 70°C, а основна частина бактеріальних ліпаз демонструють максимальну активність за температури 35 – 50°C. Також наведено в літературі дослідження, які повідомляють про мінімум температури (15°C), яка є оптимальна для даного ферменту із *Acinetobacter sp.* XMZ-26. (Javed S. та ін., 2018) Показується також, що ліпаза з *Aspergillus niger* і *Rhizos japonicas* стабільна при температурі 50°C, а ензим термотолерантної *Humicola lanuginosa* проявляє стабільність за 60°C. (Akshita M. та ін., 2017)

Ліпази можуть мати рослинне, тваринне або мікробне походження, проте саме мікробні ліпази виробляються на промисловому рівні і є найбільш поширеним класом ферментів у біотехнології та органічній хімії. Це пояснюється їхньою високою каталітичною активністю, незалежністю від сезонних факторів, можливістю генетичних модифікацій для отримання потрібних властивостей, здатністю до масового виробництва і використанням дешевших поживних середовищ. (Javed S. та ін., 2018)

У складі косметичних продуктів ліпази виконують дві ключові функції: жиророзпалюючу та очищуючу. Проникаючи в глибокі шари епідермісу та дерми, ліпаза пригнічує утворення нових адипоцитів, що запобігає накопиченню жирової тканини. Завдяки цьому ліпаза використовується як активний інгредієнт у

формулах кремів і гелів, призначених для боротьби з целюлітом і покращення структури шкіри.

Інша роль ліпази – допомога у розщепленні жирів бруду на поверхні шкіри, що може поліпшувати її текстуру, очищувати пори і зменшувати видимість недосконалостей, як от, наприклад, акне чи чорні цятки. Завдяки своїй можливості впливати на ліпіди, ліпаза застосовується для глибокого очищення шкіри та зменшення її жирності, що робить використання ензиму особливо корисним для людей із жирною або комбінованою шкірою. (Sunar K. та ін., 2016)

3.2. Розрахунок потреби ліпази

На ринку України представлено багато косметичної продукції на основі ліпази. Це різні креми, гелі, сироватки, скраби, шампуні. Короткий огляд ринку України з косметичними засобами, які місять ліпазу, наведено в *табл. 3.2.1.* В основному ці засоби є закордонними, але зустрічаються й наші українські бренди.

Таблиця 3.2.1.

Косметичний засіб	Виробник/країна	Призначення
Ензимний гель для вмивання	Mario Badescu, США	Засіб видаляє надлишки шкірного сала та забруднення; м'яко відлущує омертвілі клітини шкіри
Зволожуючий очищаючий гель	Peach&Lily, Корея	Засіб глибоко і ретельно очищає шкіру, при цьому не подразнює її, а навпаки заспокоює
Пінка для вмивання	Jan Marini, США	Потужне очищення та відлущування; покращує текстуру шкіри; підсилює сяйво
Очищаючий гель для вмивання	PCA Skin, США	Ретельно очищає шкіру від всіх видів забруднення; м'яко відлущує ороговілі клітини; заспокоює, знімає свербіж та запалення; оздоровлює загальний тон шкіри
Сиворотка	Bioderma, Франція	Зменшує видимість розширення пор, балансує шкірне сало; добре очищує шкіру обличчя
Розчин для лікування вугрового висипу	Obagi Medical, США	Розщеплює жири та очищує пори, сприяючи зменшенню акне
Гель холодного гідрування	TanoYa, Україна	Гідролізує надлишковий жир, очищує комедони.

Точковий крем для обличчя	Some by me, Корея	Знімає почервоніння, лущення та свербіж, заспокоює роздратування, та запобігає появі акне
Ензимна пудра	Biono, Україна	Добре очищає шкіру від забруднень, залишків косметики, надлишків себому

Ліпаза в даних косметичних засобах використовується перш за все з метою очищення, оскільки дуже добре розщеплює жири. Так як для очищення шкіри найчастіше використовують гелі, то розрахуємо скільки ліпази потрібно виробляти в Україні саме для них.

Ліпаза в складі косметичних засобів для очищення шкіри міститься в кількості 0,5-1% (Amery, 2015). Очисні гелі використовуються щоденно 2 рази на добу (ранком і вечором) по 1г. Станом на 2022 р частка молоді віком від 18 до 24 років, яка застосовує дані косметичні засоби становить 33,6% (\approx 1млн 370 тис), дорослі віком від 25 до 54 років – 20,1% (\approx 3млн 850 тис), старші 54 років – 3,1% (\approx 420 тис). (ProColsunting)

Таблиця 3.2.2.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в ліпазі

Група людей	Кількість засобу на добу, г	Вміст ліпази в складі засобу, %	Тривалість застосування, днів	Кількість ліпази на 1 людину, г	Кількість людей в Україні на 2022 рік, млн осіб	Загальна кількість ліпази на всіх людей, кг
Молодь віком від 18 до 24 роки	2	1	365	7,3	1,37	10001
Дорослі віком від 25 до 54 роки	2	1	365	7,3	3,85	28105
Старші 54 роки	2	1	365	7,3	0,42	3066
Всього:						41172

Отже, згідно з даними наведеними в табл. 3.2.2., потреба в ліпазі для косметичних засобів (очищувальних гелів) становить 41172 кг.

Ліпаза для косметичної галузі використовується як напівпродукт, тобто є сировиною для виготовлення косметичних засобів. Тому ліпазу пропонується виготовляти у вигляді порошку, як кінцевого продукту. Ця форма зручна для транспортування та зберігання, а також дозволяє легко дозувати і додавати фермент у косметичні засоби. Також порошок ліпази забезпечує стабільність ензиму, що дозволяє зберігати його активність протягом тривалого часу.

3.3. Розрахунок річної потужності виробництва ліпази

Станом на 2022 рік, на українському ринку косметики імпортна продукція складає більшу частину – 62,9%, ніж українська – 37,1%. (Попова І.А та ін., 2023) В свою чергу, виробництво ліпази в Україні здійснюється небагатьма підприємствами. Один з них знаходиться у м. Ладижині «Ензим», де випускаються ліпази (продуценти – грибні культури *Oospora lactis*, *Penicillium solitum*). (Некрасов П. О. та ін., 2011)

Згідно з наведеними вище розрахунками, потреба в ліпазі для косметичних засобів становить 41172 кг.

Враховуючи, що на ринку України все ж таки більша частина косметичних засобів імпортні і той факт, що не в усіх очищуючих гелях міститься ліпаза та одне підприємство випускає в Україні ліпазу, пропонуємо виробляти даний фермент для очищувальних гелів для задоволення 10 % від загальної потреби. Отже, вироблятимемо ліпазу в кількості:

$$x = \frac{41172 \cdot 10}{100} = 4117,2 \text{ кг/рік}$$

Обраний біологічний агент *Rhizopus sp.* 2000 ФМ синтезує ліпазу з активністю 437,7 Од/мл культуральної рідини в кількості 1,5 г/л (кг/м³). (Борисенко А. В. та ін., 2011) Тому, об'єм культуральної рідини, потрібної для одержання 4117,2 кг порошку ліпази, становить:

$$1,5 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$4117,2 \text{ кг} - x$$

$$x = 2744,8 \text{ м}^3$$

З огляду на витрати цільового продукту при виділенні і очищенні (40%), нам потрібно одержати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 2744,8 \text{ м}^3 \cdot 1,4 \approx 3842,7 \text{ м}^3.$$

Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для покриття річної потреби у ліпазі нам потрібно одержати (з урахуванням витрат під час виділення і очищення) $3842,7 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Порахуємо, скільки необхідно культуральної рідини одержати за один цикл культивування, щоб порахувати скільки стадій підготовки посівного матеріалу нам потрібно. Приймаємо, що кількість трудоднів – 300, тоді об'єм культуральної рідини за одну добу буде складати:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{ГП}} / T_{\text{ТР}} = 3842,7 / 300 = 12,8 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість порошку ліпази за цикл буде складати:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \cdot 12,8 \cdot 56,5) / 24 = 33,1 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл працювання ферментера, що передбачає тривалість виробничого синтезу (48 год) та період часу підготовки обладнання до роботи (8,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, приймає приймаємо до уваги, щоб урахувати допустимість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Приготування ферментера включає в себе: миття і огляд (1,5 год), контроль герметичності (1 год), нагрівання апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), остудження (1 год), заповнення поживним середовищем (2 год), посів (0,5 год), виливання культуральної рідини (1 год).

Порахувавши об'єм необхідної нам культуральної рідини за цикл і враховуючи коефіцієнт заповнення ферментера K_3 , встановлюємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_3 = 33,1 / 0,6 = 55,1 \text{ м}^3.$$

Згідно таблиці, найбільш підходящим є ферментер $V_{\text{ф}} = 50 \text{ м}^3$. Перевіряємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 33,1 / 50 = 0,65 - \text{не виходить за межі встановленого значення.}$$

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ліпази

За один цикл ми одержуємо 33,1 м³ культуральної рідини. Також необхідним є врахування її витрати на краплинонос через колектор відпрацьованого повітря (E_ф), який складає 10-15%.

Тому, враховуючи покриття втрат 10%, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу на початку виробничого біосинтезу має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 33,1 \cdot 1,1 = 36,4 \text{ м}^3$$

Таким чином, робочий об'єм ферментера дорівнює 36,4 м³. За обраного коефіцієнта заповнення (0,6) його геометричний об'єм становитиме:

$$V_{\text{ф}} = 36,4 / 0,6 = 60 \text{ м}^3$$

Найбільш підходящий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст.1}} = 63 \text{ м}^3$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{\text{з1}} = 36,4 / 63 = 0,57$. Уточнений коефіцієнт заповнення не виходить за межі встановленого значення для аеробних процесів (0,55 – 0,65), тому геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

Необхідне значення посівного матеріалу для ферментера складає 10% від об'єму поживного середовища.

Для посіву $V_{\text{роб.1}} = 36,4 \text{ м}^3$ поживного середовища слід підготувати

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \cdot X_{\text{ф}} = 36,4 \cdot 0,1 = 3,64 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

де $X_{\text{ф}}$ доза посівного матеріалу для ферментера.

Таким чином об'єм поживного середовища в ферментері буде складати:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 36,4 - 3,64 = 32,76 \approx 32,8 \text{ м}^3$$

Необхідним є врахування, що під час отримання 3,64 м³ інокуляту в посівному апараті, 10% культуральної рідини втрачається внаслідок краплиноносу через колектор відпрацьованих газів. Тому, враховуючи покриття витрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті має становити:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 3,64 \cdot 1,1 = 4 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту 4 м³, враховуючи коефіцієнта заповнення 0,6, отримують у посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 4 / 0,6 = 6,6 \text{ м}^3$. Найбільш підходящий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст2}} = 6,3 \text{ м}^3$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{32} = 4 / 6,3 = 0,63$. Уточнений коефіцієнт заповнення не виходить за межі встановленого значення для аеробних процесів (0,55 – 0,65), тому геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

Необхідне значення посівного матеріалу для посівного апарату складає 10% від об'єму поживного середовища. Тому, для засіву $V_{роб.2} = 4 \text{ м}^3$ слід підготувати:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} \cdot X_{ф} = 4 \cdot 0,1 = 0,4 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

де $X_{ф}$ доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Таким чином об'єм поживного середовища в ферментері буде складати:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 4 - 0,4 \approx 3,6 \text{ м}^3$$

Необхідним є врахування, що під час отримання $0,4 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті, 10% культуральної рідини втрачається внаслідок краплевиносу через колектор відрацьованих газів. Тому, враховуючи покриття витрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті має становити:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} \cdot (1 + E_{ф}) = 0,4 \cdot 1,1 = 0,44 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,44 \text{ м}^3$, враховуючи коефіцієнта заповнення 0,6 отримують у посівному апараті об'ємом: $V_{пс3} = 0,44 / 0,6 = 0,73 \text{ м}^3$. Найбільш підходящий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст3} = 700 \text{ л}$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{33} = 0,44 / 0,7 = 0,62$. Уточнений коефіцієнт заповнення не виходить за межі встановленого значення для аеробних процесів (0,55 – 0,65), тому геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

Необхідне значення посівного матеріалу для посівного апарату складає 10% від об'єму поживного середовища. Тому, для засіву 440 л слід приготувати:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} \cdot X_{ф} = 440 \cdot 0,1 = 44 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{ф}$ доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Таким чином об'єм поживного середовища в ферментері буде складати:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 440 - 44 \approx 396 \text{ л}$$

Необхідним є врахування, що під час отримання 44 л інокуляту в посівному апараті, 10% культуральної рідини втрачається внаслідок краплевиносу через колектор відрацьованих газів. Тому, враховуючи покриття витрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті має становити:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 44 \cdot 1,1 = 48,4 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 48,4 л, враховуючи коефіцієнта заповнення 0,6 отримують у посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па4}} = 48,4 / 0,6 = 80 \text{ л}$. Найбільш підходящий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст4}} = 80 \text{ л}$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{34} = 48,4 / 80 = 0,6$. Уточнений коефіцієнт заповнення не виходить за межі встановленого значення для аеробних процесів (0,55 – 0,65), тому геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

Необхідне значення посівного матеріалу для посівного апарату складає 10% від об'єму поживного середовища. Тому, для засіву 48,4 л слід приготувати:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} \cdot X_{\text{ф}} = 48,4 \cdot 0,1 = 4,84 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}}$ доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Таким чином об'єм поживного середовища в ферментері буде складати:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пм4}} = 48,4 - 4,84 \approx 43,5 \text{ л}$$

Необхідним є врахування, що під час отримання 4,84 л інокуляту в посівному апараті, 10% культуральної рідини втрачається внаслідок краплевиносу через колектор відрацьованих газів. Тому, враховуючи покриття витрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті має становити:

$$V_{\text{роб.5}} = V_{\text{пм4}} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 4,84 \cdot 1,1 = 5,3 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 5,3 л враховуючи коефіцієнта заповнення 0,6 отримують у посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па5}} = 5,3 / 0,6 = 8,8 \text{ л}$. Найбільш підходящий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст5}} = 10 \text{ л}$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{35} = 5,3 / 10 = 0,55$. Уточнений коефіцієнт заповнення не виходить за межі встановленого значення для аеробних процесів (0,55 – 0,65), тому геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

Необхідне значення посівного матеріалу для посівного апарату складає 10% від об'єму поживного середовища. Тому, для засіву 48,4 л слід приготувати:

$$V_{\text{пм5}} = V_{\text{роб.5}} \cdot X_{\text{ф}} = 5,3 \cdot 0,1 = 530 \text{ мл посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}}$ доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Таким чином об'єм поживного середовища в ферментері буде складати:

$$V_{\text{пс5}} = V_{\text{роб.5}} - V_{\text{пм5}} = 5,3 - 0,53 \approx 4,77 \text{ л}$$

Отримання посівного матеріалу $V_{пс5} = 0,53$ л (530 мл) для засіву інокулятора здійснюють вирощуванням мікроорганізмів у колбах на качалках. Для цього застосовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Таким чином, необхідне число колб складатиме:

$$N_{колб} = V_{пс5} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 530 / (750 \cdot 0,2) = 4 \text{ колб}$$

Отже, враховуючи результати попередніх розрахунків, для біосинтезу ліпази за допомогою мікроорганізмів *Rhizopus sp.* 2000 ФМ потрібно встановити ферментер об'ємом 63 м³, інокулятори об'ємом 6,3 м³, 700, 80, 10 л та 4 качалочних колб.

Таблиця 3.3.1.

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культураної рідини $V_{кр}, \text{м}^3 (\text{л})$	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{роб}, \text{м}^3 (\text{л})$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}, \text{м}^3 (\text{л})$	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}, \text{м}^3 (\text{л})$	Коефіцієнт заповнення $K_{зп}, \text{частка}$	Геометричний об'єм ферментера $V_{ст}, \text{м}^3 (\text{л})$
1	2	3	4	5	6	7
VI	33,1 м ³	36,4 м ³	3,64 м ³	32,8 м ³	0,57	63 м ³
V	3,64 м ^{3**}	4 м ³	0,4 м ³	3,6 м ³	0,63	6,3 м ³
IV	0,4 м ³	0,44 м ³	44 л	396 л	0,62	700 л
III	44 л	48,4 л	4,84 л	43,5 л	0,6	80 л
II	4,84 л	5,3 л	0,53 л	4,7 л	0,55	10 л
I	530 мл	530 мл	-	530 мл	0,2	4 колб

* з урахуванням E_{ϕ}

** об'єм КР за один виробничий цикл, розраховано в п. 3.2.

РОЗДІЛ 4

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ ЛІПАЗИ

Виділення та очищення ліпаз є трудомістким і складним процесом, який займає ключову роль у можливості їх подальшого використання. У косметології застосовують лише ферменти з високим ступенем очищення.

Ліпаза, синтезована штамом *Rhizopus sp. 2000 ФМ*, є екзометаболітом, тобто утворюється у культуральній рідині, що виключає необхідність вилучення продукту з клітин продуцента. Для забезпечення збереження активності цільового продукту під час виділення й очищення необхідно ретельно підбирати стадії цього процесу, орієнтуючись на літера. (Bharathi D. & Rajalakshmi G., 2019), (Ali S. та ін., 2023), (Saxena R. K. та ін., 2013)

Тому після аналізу літературних даних було сформовано наступну схему етапів виділення та очищення ліпази для косметології:

1. Відокремлення біомаси (центрифугування)
2. Концентрування (ультрафільтрацією)
3. Осадження сульфатом амонію
4. Відокремлення осаду (центрифугування)
5. Іонообмінна хроматографія
6. Сушіння в розпилюючій сушарці
7. Фасування і пакування

Видалення біомаси є початковою стадією процесу виділення та очищення ліпази. На цьому етапі відбувається часткове очищення культуральної рідини від домішок. Основним призначенням є отримання супернатанту з максимальною чистотою та мінімальними витратами, що створює умови для успішного виконання наступних етапів.

Існує кілька методів відділення біомаси продуцента, із яких найбільш

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тромпак В.Ю			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції ліпази	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О					44	95 44
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П						

використовувані: фільтрування та центрифугування.

Центрифугування – це метод розділення неоднорідних розчинів під дією відцентрових сил. Основними перевагами цього методу є висока швидкість процесу в порівнянні з іншими способами, ефективне очищення культуральної рідини від грубих частинок, що в ній містяться, можливість безперервного виконання процесу, висока ступінь концентрування, висока продуктивність.

Однак має центрифугування і ряд недоліків: висока енергоємність, складність конструкції та вартість; складність експлуатації (вібрація, необхідність періодичної розбирання і миття, ненадійність, шум); вплив на клітину відцентрової сили, складність герметизації і забезпечення стерильних умов ведення процесу.

Фільтрація базується на затримці біомаси на пористій поверхні фільтрувальної перегородки. У процесі фільтрування культуральної рідини відбувається утворення дрібнозернистого осаду, який створює значний опір, що вимагає регулярної заміни фільтрувальних перегородок. Середня швидкість фільтрації становить лише 50 л/м² на годину. Тому, через великий об'єм культуральної рідини використання фільтрації для відокремлення біомаси є недоцільним через довготривалість процесу. (Bharathi D. & Rajalakshmi G., 2019)

Оскільки в нашому середовищі для культивування продуцент утворює розгалужений міцелій, то фільтрування може бути утрудненим. Так наприклад, при фільтрації культуральних рідин із розгалуженим міцелієм питомий опір, утвореного драглистого осаду, є дуже високим. Також тонкий шар осаду, який всеодно залишається після зрізання ножом, значно знижує швидкість фільтрації. Тому, після аналізу методів, оптимальним рішенням для відокремлення біомаси є використання фільтруючої центрифуги. Вона дозволяє швидко обробляти більші об'єми культуральної рідини, а фільтраційні елементи запобігають забій центрифуги від міцелію грибів.

Біомасу центрифугують при 8000 об/хв ($8000 \times g$) протягом 20 хв. (Bharathi D. & Rajalakshmi G., 2019).

Наступний етап – концентрування.

Для концентрування супернатанту, в основному, застосовують один з двох способів:

- концентрування вакуум-випаровуванням;
- ультрафільтрація.

Попри використання високопродуктивних вакуум-випарних апаратів, повністю усунути недоліки методу вакуум-випарування, зокрема вплив на активність продукту та утворення небажаних осадів, не вдалося. У зв'язку з цим вакуум-випарування замінюється ультрафільтрацією, яка є більш ефективною.

Ультрафільтрація – це метод мембранного розділення, що дозволяє розмежувати розчини на високомолекулярні та низькомолекулярні сполуки, а також здійснювати фракціонування та концентрування високомолекулярних речовин. Процес відбувається шляхом пропускання розчину через мембрану розміром близько 0,1 мкм під дією різниці тиску по обидва боки. Застосування ультрафільтрації сприяє підвищенню виходу готового продукту, покращенню його якості та значному скороченню кількості стадій технологічного процесу. Якщо домішки мають невелику молекулярну масу, метод дозволяє отримати концентрат чистого продукту, виступаючи як ефективніший аналог діалізу. Ультрафільтрація є менш трудомістким і швидшим процесом, після чого високопроникливі мембрани очищаються в 10-100 разів швидше, ніж при аналогічному процесі діалізу.

Використання ультрафільтрації для розділення речовин має великі переваги:

- немає необхідності у хімікатах;
- виконується висока ступінь розділення, яка дає змогу ще раз застосовувати розділені фази;
- процес є незалежним від стійкості початкового розчину, а також від походження і концентрації наявних у ній електролітів;
- немає необхідності у підводі тепла, тому питомі втрати енергії незначні;
- простота технологічної схеми і апаратури;
- невеликі розміри установки.

Отриманий супернатант після відділення біомаси є водним розчином, що містить високомолекулярні речовини (супутні білки та фермент ліпази з молекулярною масою 45 кДа) і низькомолекулярні компоненти (залишки солей із середовища). Тому, найкращим способом концентрування супернатанту є ультрафільтрація, оскільки процес дозволяє видалити низькомолекулярні речовини та значну частину води, при цьому отримуючи концентрат супутніх білків разом з ліпазою. (Тертишний О.О. & Тертишна О. В., 2011) Визначаємо діаметр пор для ліпази згідно рівняння Стокса: $D_{\text{мол}}=0,098 \times M^{0,38}=0,098 \times 45\,000^{0,38}=5,7$ нм або 0,005 мкм. (де М – молекулярна маса в Да). Тоді розмір мембрани повинен бути 0,005 мкм або 5 нм.

Наступний етап – осадження сульфатом амонію.

Ліпази є достатньо чутливими до впливу розчинників, тому що під їхньою дією дуже часто помічається часткова денатурація білка, яка може спричинити зміни організації активного центру, а тому і втрати активності. В літературі, науковцями використано 60% процедур очищення ліпази осадженням сульфатом амонію, тоді як 35% застосовували етанол, ацетон або кислоту (зазвичай соляна кислота). (Chung Н. Т та ін., 2015) Тому, для одержання ліпаз краще застосовувати сіль сульфат амонію, оскільки вона добре розчиняється у воді і на велику частину ферментів не впливає негативно, а навпаки — навіть може стабілізувати ензим, і тому при роботі з ним немає потреби здійснювати фракціонування білків за низької температури. Також дуже важливо, щоб дана сіль була високої якості і не вносила в розчин токсичних домішок або вільної кислоти, що присутня у деяких зразках амоній сульфату. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014)

Тому, для осадження ліпази будемо використовувати сульфату амонію. Фермент осаджується в розчині з концентрацією солі 70% в реакторі-збірнику з лопатевою мішалкою.

Після осадження необхідно відокремити потрібний нам осад з ліпазою. Для цього пропонується використовувати центрифугування. Перевагами її є: вища ефективність, оскільки центрифугування дозволяє ефективно відокремити

частинки різних розмірів та щільностей; швидкість процесу, оскільки центрифугування зазвичай швидше, ніж фільтрація, бо не залежить від забруднення фільтра або зниження пропускної здатності через накопичення осаду; мінімізація зупинок на обслуговування, оскільки центрифуги менш потребують обслуговування порівняно з фільтрами, які часто забруднюються та потребують заміни або очищення. (Bharathi D. & Rajalakshmi G., 2019)

Осадження, в основному, застосовується як початкова стадія грубого розділення речовин у процесі очищення. Цей метод використовується переважно на ранніх етапах, після чого іде більш точне очищення ліпази за допомогою різних хроматографічних способів.

Хроматографія – це метод розділення сумішей речовин, який ґрунтується на різній швидкості руху компонентів розчину через певне середовище (стовп чи пластину). Цей процес дозволяє відокремити окремі компоненти суміші на основі їх різної взаємодії з рухомою та нерухомою фазами.

На сьогодні, розрізняють кілька видів хроматографії, кожен з яких застосовує різні принципи розділення.

Афінна хроматографія використовується для розподілу біомолекул на підставі специфічної взаємодії з лігандом, приєднаним до нерухомої фази, і цільовою молекулою. Цей спосіб дає високоспецифічне розділення, однак є сильно дороговартісним, тому доцільно його застосовувати для малих виробничих потужностей, а також його неможливо автоматизувати, тому слід його відкинути. (Тертишний О.О. & Тертишна О. В., 2011)

Гель-фільтрація є способом розподілу речовин на основі їх розміру. Перевагами її є висока роздільна здатність для різних розмірів молекул, однак якщо молекули мають подібні розміри, розділення може бути не достатньо ефективним. Недоліком є висока вартість гелів для фільтрації, а також повільність процесу.

Метод іонообмінної хроматографії ґрунтується на зв'язуванні іонізованих груп речовин з протилежно зарядженими групами іонообмінників (катионообмінників чи аніонообмінників). Сила зв'язку ферменту із смолою

дорівнює заряду білка. Даний спосіб забезпечує високе та точне очищення ліпази від інших білкових молекул із різним зарядом, що сприяє одержанню продукту з високою чистотою. А також його можна застосовувати в промислових масштабах, тому зупинимось на ньому.

Для очищення ферменту ліпази найчастіше застосовується аніонообмінна смола – діетиламіноетилцелюлози, оскільки вона має "пухку" структуру, завдяки якій ензим проникає всередину частинки іонообмінника. (Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О., 2014) Для того, щоб усунути залишки неактивних білків та інших супутніх домішок, аніонообмінну смолу очищують промивкою великої кількості стартового буфера (20 – 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5 – 8,5)

Також перед іонообмінною хроматографією осад ліпази ресуспендують в 10 мМ натрій цитратно-фосфатному буфері (рН 4,5)

У колонці разом із буферним розчином (20 – 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5 – 8,5) упаковують адсорбент (діетиламіноетилцелюлози), на який наносять досліджуваний зразок у невеликому об'ємі розчинника. Компоненти суміші з білковою природою, що розділяються, зв'язуються з іонообмінником за рахунок електростатичних сил між зарядженими поверхнями білків і кластерами заряджених груп на іонообміннику. Ферменти, адсорбовані на іонообмінному полімері, змивають буферним розчином із наростаючою концентрацією солі (10мМ трис-НСl + 0,1М хлорид натрію; 10мМ трис-НСl + 0,5М хлорид натрію). Під час елюції натрієві іони конкурують із позитивно зарядженими групами молекул. Білки із менш позитивним зарядом вимиваються з колонки зразу, а з більш великим зарядом – останніми. Фракції білка накопичують за допомогою автоматичного колектора фракцій (Rajni H., 2003)

Після хроматографії, очищену ліпазу отримують у суміші разом з буферним розчином, тому доцільним є ще використання ультрафільтрації для концентрування розчину і одержання чистої розчинної ліпази у воді. Таким чином, розчин пропускають через ультрафільтраційну мембрану, яка затримує ліпазу на мембрані (оскільки її молекулярна маса більша), а солі буфера проходять крізь мембрану (оскільки мають маленьку молекулярну масу) і ідуть на

утилізацію. В результаті ультрафільтрації отримуємо чистий розчин високочищеної ліпази.

Коли вже ліпаза високоочищена, то наступним етапом буде сушіння продукту. Для одержання ферментних препаратів можна використовувати такі способи сушіння: вакуум-висушування, сублімаційне сушіння або сушіння в розпилювальній сушарці.

При вакуум-висушуванні сушіння проходить періодично. У шафи на полицях кладуть вологий матеріал, роблять вакуум і починають гріти парою шафи через пустоти в плитах або електричним струмом. (Карлаш Ю.В. & Омельчук Є.О., 2019)

Шар осаду, що сушиться, повинен бути не більше 0,5 см завтовшки. Сушка проходить за температури 30 °С. Спочатку матеріал нагрівається до температури сушки, в результаті чого з поверхні видалається вся волога. Під час другого етапу сушки волога випаровується з глибоких шарів.

Втрати активності під час такої сушки становить від 6 до 10%. Процес сушіння триває від 8 до 16 годин. Сушіння осаду проходить у вакуумних сушильних шафах на листах целофану, оскільки цей матеріал дозволяє легко відокремити препарат після висушування. Основним недоліком є обмежений об'єм сушильних шаф та тривалий час сушки. (Тертишний О.О. & Тертишна О. В., 2011)

Сублімаційне сушіння ліпази – це процес, який застосовується для видалення води з ліпази, перетворюючи її в пару при низьких температурах, що дозволяє зберегти активність ферменту. Зазвичай цей метод використовують після первинного заморожування біологічного матеріалу, щоб уникнути пошкодження структури молекул ліпази внаслідок високих температур. Перевагами даного методу є збереження структури та активності ліпази, оскільки температура не перевищує рівень, який може призвести до денатурації білка.

Безперечно сублімаційне сушіння має більший ряд переваг, ніж вакуум-висушування, однак враховуючи те, що сублімаційне сушіння – це дуже

дороговартісний процес, для якого потрібна наявність складної апаратури та тривалість висушування дуже велика (до 48 год), то краще відмовитись від нього.

Розпилювальна сушарка є ефективним і зручним в обслуговуванні пристроєм, який використовується для сушіння розчинів. У цьому процесі розчин подається різко на відцентровий механізм і розпилюється на частини розміром 60-70 мкм. Теплоносій надходить знизу через спеціальну насадку конічної форми з тангенціальними щілинами, що забезпечує високу швидкість його руху. Завдяки великій швидкості руху частинок суспензії і великому контакту поверхні з теплоносієм, процес сушки триває не довго — препарат перебуває в сушарці всього 20-30 секунд. Волога майже миттєво випаровується під час контакту з теплоносієм, і частини швидко охолоджуються. Тому, незважаючи на високу температуру теплоносія на вході і виході з сушарки, температура препарату не перевищує 35-45 °С. Для сушіння ферментного осаду температура теплоносія на вході становить 130-135 °С, а на виході — 60-75 °С. Це дозволяє досягти вологості матеріалу 8-12% за короткий час, а втрати матеріалу на цій стадії становлять 5 – 10%.

Отже, проаналізувавши наведений матеріал, можна зробити висновок, що для сушіння концентрату цього ферменту найкращим вибором є розпилювальна сушарка. Такий метод дозволяє значно прискорити процес сушки та уникнути додаткових стадій подрібнення препарату, завдяки швидкому та ефективному видаленню вологи.

Для роботи розпилювальної сушарки нам потрібно додатково приготувати нагріте стерильне повітря.

Після висушування готовий порошок фасують і пакують. Мікробіологічний препарат мікробної ліпази випускатиметься у вигляді порошку в баночках по 500 г та 1 кг з високоякісного пластику, що дозволить захистити її від вологи та світла. Вони мають бути зроблені із матеріалу, який не взаємодіє з ферментом ліпазою і не пропускає через себе світло (наприклад, поліетилен високої щільності, поліпропілен або поліетилентерефталат).

Додатково на баночках з готовим продуктом ліпази розміщують етикетку. На ній наводять наступну інформацію: назва самого препарату, кількість, дата виробництва, номер партії, умови зберігання, термін придатності, адрес виробника тощо.

4.1. Підбір технологічного обладнання з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях наведено в *табл. 4.1.1.*

Таблиця 4.1.1.

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом ...%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ДР 2 Підготовка натрій фосфат-цитратного буферу						
1	ДР 2 Підготовка натрій фосфат-цитратного буферу	Натрій фосфат	3,22 кг	-	-	Збірник об'ємом 200 л
2		Натрій цитрат	2,05 кг	-	-	
3		Вода	123 л	-	-	
4		Буферний розчин	-	-	125 л	
ДР 3 Підготовка Трис-НСІ буферу для елювання						
5	ДР 3 Підготовка трис-НСІ буферу	Трис	303 г	-	-	Збірник об'ємом 300 л
6		НСІ	1,46 л	-	-	
7		Вода	248 л	-	-	
8		Буферний розчин для елювання	-	-	250 л	
ТП 4 Зберігання культуральної рідини						
9	ТП 4 Зберігання культуральної рідини	КР	36,4 м ³	-	36,4 м ³	Збірник КР 63 м ³

ТП 5 Відокремлення біомаси						
10	ТП 5 Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	182 кг АСБ, з урахуванням 90% вологості	-	182 кг	Центрифуга продуктивністю 300 кг/год
11		Кількість ліпази	54,6 кг	1,6 кг (3%)	53 кг	-
12		Фураг	36,1 м ³	-	36,1 м ³	
ТП 6 Концентрування супернатанту						
13	ТП 6 Ультрафільтрація супернатанту	Фураг	36,1 м ³	-	-	Ультрафільтраційна установка продуктивністю 25 м ³ /год
14		Пермеат	-	-	28,9 м ³	
15		Кількість ліпази	53 кг	4,2 кг (8%)	48,8 кг	-
16		Концентрат	7,2 м ³	-	7,2 м ³	Реактор-змішувач об'ємом 15 м ³
ТП 7 Осадження цільового продукту						
17	ТП 7 Осадження сульфатом амонію	Концентрат	7,2 м ³	-	-	-
18		Амоній сульфат	6,5 т	-	-	
19		Маса осаду ліпази	48,8 кг	4,9 кг (10%)	43,9 кг	
20		Суміш, що містить осад ліпази	-	-	13,7 м ³	
ТП 8 Відокремлення осаду						
21	ТП 8 Центрифугування	Суміш, що містить осад ліпази	13,7 м ³	-	-	Центрифуга продуктивністю 300 кг / год

22		Вологий осад	43,9 кг	2,2 кг (5%)	41,7 кг	Збірник об'ємом 300 л
23		Фугат	-	-	13,2 м ³	На утилізацію
ТП 9 Ресуспендування осаду						
24	ТП 9 Ресуспендування осаду	10 мМ натрій цитратно-фосфатний буфер, рН = 4,5	125 л	-	125 л	
25		Вологий осад ліпази	41,7 кг	0,42 кг (1%)	41,3 кг	
26		Розчин ліпази	-	-	166,3 л	
ТП 10 Очищення ліпази						
27	ТП 10 Іонообмінна хроматографія	10 мМ Трис-НСІ буфер для врівноваження колонки (1:3)	124 л	-	124 л	Іонообмінний хроматограф
28		Розчин ліпази	166,3 л	-	-	
29		10 мМ Трис-НСІ для елювання (рН = 7,5 – 8,5)	123,9 л	-	-	
30		Кількість ліпази	41,3 кг	4,1 кг (10%)	37,2 кг	
31		Очищений розчин ліпази	-	-	161,1 л	
ТП 11 Ультрафільтрація						
32	ТП 11 Ультрафільтрація	Початковий розчин	161,1 л	-	-	На утилізацію
33		Пермеат	-	-	81 л	

34		Кількість ліпази	37,2 кг	1,86 (5%)	35,34 кг	Ультрафільтр-траційна установка
35		Високоочищений розчин ліпази	-	-	80 л	
ТП 12 Сушіння						
36	ТП 11 Висушування в розпилюючій сушарці	Високоочищений розчин ліпази	80 л	-	-	Розпилююча сушарка
37		Кількість ліпази	35,3 кг	-	-	
38		Сухий осад ліпази (10% вологи)	-	3,9кг (10%)	35,1 кг	Переносна ємність об'ємом 40 л
ПМФ 13 Фасування, пакування						
39	ПМФ 12 Фасування, пакування	Готовий порошок ліпази	35,1 кг	-	-	Ручне фасування в баночки
40		Баночки	-	0,7 кг (2%)	34,4 кг	

4.2. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання для післяферментаційних етапів виділення і очищення ліпази наведена в *табл. 4.2.1.*

Таблиця 4.2.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	Вентиляційна шахта Lindab («alpix»). Матеріал корпусу: оцинкована сталь; габаритні розміри мм: 1300x400x400 (Alpix)

Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки TION O2 («Квант успіху») Фільтрувальний матеріал: тканина синтетична; E=80-90%; габаритні розміри, мм: 141x70x17 (Квант успіху)
Ф-3	Головний фільтр очистки повітря	1	Кишеньковий фільтр ФЯК F9 287x592x600-4 («AS Filter») Фільтрувальний матеріал: синтетичне полотно; E>95%; габаритні розміри, мм: 287x592x600 (AS Filter)
Ф-4	Індивідуальний фільтр	1	Повітряний фільтр SPF005-0310PM («REMEZA») Фільтрувальний матеріал: боросилікатне мікрОВОлокно; E=99,999%; робоча температура до 120°C; робочий тиск до 16 бар; габарити, мм: 225x116x76,1 (Компресорне обладнання)
Т-5	Теплообмінник нагрівач	1	Нагрівач повітря НКВ 100x500-2. («Вентс») Мінімальний робочий тиск: 16 бар; габаритні розміри: 1165x540x200 (ВЕНКОН)
З-6	Збірник для приготування 10 мМ нарій цитратно-фосфатного буферу	1	Збірник об'ємом 200 л AISI 304 («WiseMaster»). Матеріал – нержавіюча сталь; продуктивність мішалки – 80 об/хв; потужність – 0,75 кВт; робочий тиск – 0,9 - + 0,7 бар; температура до 95°C. Габаритні розміри, мм: 500 x 480 x 1500. (WiseMaster,1)
ДЗ-7	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв. (mBev)

Н-8	Перестальтичний насос для перекачування розчину	1	Перистальтичний насос МР-8. («DEVEM»). Продуктивність: 101 – 462 л/год; тиск – до 1,4 бар; потужність – 0,09 кВт. (DEVEM)
З-9	Збірник для приготування 10 мМ Трис-НСІ буферу	1	Збірник на 300 л. Матеріал – нержавіюча сталь; продуктивність мішалки – 80 об/хв; потужність – 0,75 кВт; робочий тиск – 0,9 - + 0,7 бар; температура до 95°C. Габаритні розміри, мм: 650 x 500 x 1600. (Prom,2)
ДЗ-10	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв. (mBev)
Н-11	Перестальтичний насос для перекачування розчину	1	Перистальтичний насос МР-8. («DEVEM»). Продуктивність: 101 – 462 л/год; тиск – до 1,4 бар; потужність – 0,09 кВт. (DEVEM)
З-12	Збірник культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 63 м3. Містить сорочку та лопатеву мішалку із частотою обертів 100 об/хв; потужність двигуна: 0,75 кВт; містить датчики температури, габаритні розміри, мм: 8000x7940x7940. (WiseMaster,2)
Н-13	Відцентровий насос для перекачування культуральної рідини до центрифуги	1	Насос відцентровий LEO (775316) («Sigma»). Потужність: 800 Вт; матеріал робочого колеса: технополімер; висота напору: 40 м; продуктивність: 50 л/хв; тиск: 7 бар. (Sigma Ukraine)
Ц-14	Центрифуга для відокремлення біомаси	1	Промислова центрифуга КП-223. Матеріал – нержавіюча сталь; продуктивність: 300 кг/год; частота обертів – до 12000 об/хв; потужність – 4 кВт; габаритні розміри, мм: 1605 x 1150 x 1170. (Prom,1)

УФУ-15	Ультрафільтраційна установка	1	Система ультрафільтрації Toqua UFS 572T-S. Продуктивність: 22 – 30 м ³ /год; кількість мембран – 5 шт; площа фільтрації – 360 м ² ; вихідний тиск – 1,0 – 7,0 атм. (Prom,3)
Р-16	Реактор-змішувач	1	Реактор-збірник об'ємом 15 м ³ . Містить парову та охолоджувальну рубашку, мішалку. Робочий тиск 0,6 МПа, робоча температура від -20 до +200°С. Габаритні розміри, мм: 2000x1770x1770. (Proстанки)
ДЗ-17	Ваговий дозатор для подачі амоній сульфату	1	Ваговий дозатор для сипких продуктів («Техноваг»). Продуктивність до 200 т/год; похибка зважування – 0,1%. (Автовес).
Н-18	Насос відцентровий для перекачування вологого осаду	1	Насос відцентровий LEO (775316) («Sigma»). Потужність: 800 Вт; матеріал робочого колеса: технополімер; висота напору: 40 м; продуктивність: 50 л/хв; тиск: 7 бар. (Sigma Ukraine)
Ц-19	Центрифуга для відокремлення осаду ліпази	1	Промислова центрифуга КП-223. Матеріал – нержавіюча сталь; продуктивність: 300 кг/год; частота обертів – до 12000 об/хв; потужність – 4 кВт; габаритні розміри, мм: 1605 x 1150 x 1170. (Prom,1)
З-20	Збірник для ресуспендування осаду	1	Збірник на 300 л. Матеріал – нержавіюча сталь; продуктивність мішалки – 80 об/хв; потужність – 0,75 кВт; робочий тиск – 0,9 - + 0,7 бар; температура до 95°С. Габаритні розміри, мм: 650 x 500 x 1600. (Prom,2)

Н-21	Насос перестальтичний для перекачування вологого осаду до хроматографа	1	Перистальтичний насос МР-8. («DEVEM»). Продуктивність: 101 – 462 л/год; тиск – до 1,4 бар; потужність – 0,09 кВт. (DEVEM)
ІХ-22	Іонообмінний хроматограф для очищення ліпази	1	Іонний хроматограф 940 («Unilab»). Інтелектуальні компоненти: насос високого тиску iPump; детектори iDetector; реактор iReactor; колонка iColumn; система дозування 800 Dosins. Швидкість потоку: 0,001 – 20 мл/хв; відтворюваність $\leq 0,1\%$; температура колонки – 0 ... 80°C. (Unilab)
УФУ-23	Ультрафільтраційна установка	1	Система ультрафільтрації Тогау UFS 572Т-S. Продуктивність: 22 – 30 м ³ /год; кількість мембран – 5 шт; площа фільтрації – 360 м ² ; вихідний тиск – 1,0 – 7,0 атм. (Prom,3)
С-24	Розпилювальна сушарка для осушування ліпази	1	Розпилювальна сушильна установка УРС-5 METALIS. Матеріал – нержавіюча сталь; продуктивність 5 кг/год; температура повітря всередині до 200°C. Габаритні розміри, мм: 1850x2100x1000. (Prom,4)

РОЗДІЛ 5

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛІПАЗИ

Технологічна схема післяферментаційних процесів виділення та очищення ліпази включає допоміжні роботи (ДР): підготовка стерильного аераційного повітря; приготування 10 мМ натрій цитрат-фосфатного буферного розчину для ресуспендування осаду; 10 мМ трис-НСІ буферного розчину для врівноваження колонки та елювання. Стадії основного технологічного процесу включають зберігання культуральної рідини; відокремлення біомаси за допомогою центрифугування; концентрування фугату; попереднє очищення ліпази за допомогою осадження сульфатом амонію з наступним центрифугуванням для відділення осаду ліпази; ресуспендування осаду; очищення за допомогою іонообмінної хроматографії; ультрафільтрація, сублімаційне сушіння ліпази. На останок іде стадія пакування, маркування та фасування готового продукту.

Технологічна та апаратурна схема післяферментаційних етапів виділення і очищення ліпази наведена в графічній частині.

ДР 1. Підготовка нагрітого повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря.

Забір атмосферного повітря проводять за допомогою труби з повітрозбірником (ПЗ-1) у точці Н=15 м.

ДР 1.2. Груба очистка повітря.

Попередню очистку повітря від ДР 1.1 реалізують на фільтрі грубого очищення (Ф-2). Від грубих домішок очищення здійснюють з ефективністю 80-90%, при цьому затримуються частки діаметром більше 3 мкм.

ДР 1.3. Тонка очистка повітря

Попередньо очищене повітря від ДР 1.2 далі рухається через головний фільтр очистки (Ф-3). Через нього не проходять частки розміром 2-10 мкм, а

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>			РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми етапів виділення і очищення ліпази	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>					60	95
						60		
<i>Н. Контр.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						

ефективність процесу досягається 95%.

ДР 1.4. Надочищення повітря

Тонко очищене повітря від ДР 1.3 далі рухається через індивідуальний фільтр (ІФ-4) для високого ступеня очистки. Вони затримують часточки розміром 0,3-0,4 мкм з великим ступенем очистки - 99,999%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Очищене повітря від ДР 1.4. проходить у теплообмінник-нагрівач (Т-5), який нагріває його до температури 65°C за допомогою гарячої води.

ДР 2. Підготовка 10 мМ буферного натрій фосфатно-цитратного розчину

Для приготування 125 л 10 мМ натрій цитратно-фосфатного буферу у збірник (З-6) додають 2,05 кг натрій цитрату та 3,22 кг натрій фосфату, зважених на технічних терезах. Далі через об'ємний дозатор (ДЗ-7) додають 123 л води питної та включають перемішуючи пристрій. Отриманий розчин перекачують перестальтичним насосом (Н-8) до збірника ресуспендування осаду (З-20).

ДР 3. Приготування 10 мМ Трис-НСІ буферу для елювання

Для приготування 250 л 10 мМ трис-НСІ буферу у збірник (З-9) додають 303 г трис та 1,46 л хлоридної кислоти, зважених на технічних терезах. Далі через дозатор об'ємний (ДЗ-10) доливають 248 л питної води і вмикають мішалку. Готовий розчин подають перестальтичним насосом (Н-11) до іонообмінного хроматографа (ІХ-22) для врівноваження колонки.

ТП 4. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину об'ємом 5,95 м³ зберігають в збірнику (З-12) об'ємом 63 м³. За допомогою води охолодженої, яка подається в сорочку, підтримують температуру на рівні 4°C.

ТП 5. Центрифугування культуральної рідини

Із збірника (З-12), культуральна рідина передачується відцентровим насосом (Н-13) на фільтруючу центрифугу безперервної дії (Ц-14) з верхнім вивантаженням осаду, де проводиться центрифугування за 8000 об/хв протягом 20 хвилин.

Після закінчення процесу фільтрат виводять через низ центрифуги та подають на ультрафільтраційну установку (УФУ-15), а осад біомаси падає у мішок, де і збирається. Після того, як мішок заповнюється повністю, осад вивантажується і надходить на стадію знешкодження відходів.

ТП 6. Концентрування супернатанту

Концентрування культуральної рідини проводиться шляхом пропускання супернатанту чрез мембрану ультрафільтраційної установки УФУ-16. Розміри пор мембрани становить 5 нм. Під час даного процесу одержуємо концентрат, що подається до реактора для осадження Р-17.

ТП 7. Осадження ліпази сульфатом амонію

У реактор (Р-17), де раніше подали концентрат, поступово додають через ваговий дозатор (ДЗ-18) 6,5 т солі амоній сульфату за перемішування 100 об/хв протягом 20 хв.

Після того, як дана сіль досягне необхідної концентрації (70%), суміш залишають при температурі 4°C на 2 години, для того, щоб вся ліпаза перейшла в осад та осіла на дно.

Далі суміш осаду виводять внизу збірника і доставляють до центрифуги (Ц-19) за допомогою відцентрового насосу (Н-18).

ТП 8. Відокремлення осаду ліпази центрифугуванням

Подана суміш в центрифугу безперервної дії (Ц-19) із нижнім вивантаженням осаду, піддається центрифугуванню за умов 14 000 об/хв протягом 20 хв.

Після цього знизу виводять осад ліпази та подають у збірник (З-20). А розчин, який лишається, відправляють на знешкодження.

ТП 9. Ресуспендування осаду

У збірник (З-20), який вміщає осад ліпази, додається натрій фосфатно-цитратний буфер від ДР 2 за умов постійного перемішування з 100 об/хв тривалістю 20 хв.

Далі готовий розчин виводять знизу збірника і направляють до іонообмінного хроматографа (ІХ-22) за рахунок перистальтичного насосу (Н-21).

ТП 10. Іонообмінна хроматографія

Осад ліпази, який отримали після осадження сіллю сульфу амонію, направляють з збірника (З-20) на іонообмінну колонку (ІХ-22) об'ємом 8 – 10 л, попередньо заповнену іонообмінником - діетиламіноетилцелюлози, та врівноважену 10 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,0-7,5.

Сорбований білок елюють із колонки, за допомогою градієнта солей, пропускаючи через неї 10 мМ Трис-НСІ + 0,1 М хлорид натрію та 10 мМ Трис-НСІ + 0,5 М хлорид натрію.

ТП 11. Ультрафільтрація

Очищений розчин ліпази піддають ультрафільтрації, для того, що отримати чистий розчин, без ніяких буферів. Для цього його пропускають через ультрафільтраційну установку (УФУ-23). Розміри пор мембрати становлять 5 нм. Після цього отримують високоочищений концентрований розчин ліпази, який можна сушити у розпилюючій сушці (С-24)

ТП 12. Висушування в розпилюючій сушарці

Процес висушування ліпази здійснюється в розпилюючій сушарці С-24. Вологий розчин ферменту від УФУ- 23 запускають крізь розпилювач, який розпилює рідину на дрібні краплини. Також сюди подається додатково приготоване стерильне гаряче повітря від ДР-1 з температурою 60°C. Розпилюючі краплі, змішуючись з гарячим повітрям, швидко висушуються, залишаючи сухий порошок ліпази (вологість 10%), який на виході поміщають в переносну ємність об'ємом 20 л.

ПМФ 13. Фасування ліпази в баночки

Готовий порошок ліпази фасують і попередньо підготовлені по 0,5 чи 1 кг баночки з високоякісного пластику, що забезпечить захист від вологи і світла. На них обов'язково клеють етикетки. На етикетці повинна бути наступна інформація: назва самого препарату, кількість, дата виробництва, номер партії, умови зберігання, термін придатності, адрес виробника тощо.

РОЗДІЛ 6

ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ОЧИЩУВАЛЬНОГО ГЕЛЮ З ЛІПАЗОЮ У СКЛАДІ

6.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки косметичного гелю

Ліпаза — це ензим, який розщеплює жири на гліцерин і жирні кислоти, тож її додавання до очищувального гелю забезпечує низку важливих переваг, що робить її однією із найкращих інгредієнтів у косметиці. По-перше, ліпаза розщеплює жири, що діють на поверхню шкіри, передусім надлишковий себум, який є головним складником шкірного жиру. По-друге, її дія є м'якою і делікатною, тому вона не руйнує гідроліпідний бар'єр шкіри, дозволяючи зберегти вологу та уникнути відчуття стягнутості. Нарешті, сучасні косметичні продукти, такі як, наприклад, водостійкий макіяж або сонцезахисні креми, містять ліпідні компоненти, які дуже важко усунути звичайними засобами. А ліпаза в очищувальному гелі ефективно розщеплює ці речовини, сприяючи глибокому очищенню навіть від найбільш стійких забруднень. (Дехтяренко & Пескова, 2018)

Тому, ліпаза є ідеальною складовою очищувального гелю завдяки своїй можливості ефективно, надійно та м'яко розщеплювати ліпіди, забезпечуючи чистоту та здоров'я поверхні шкіри без різних подразнень. Її можна застосовувати для всіх типів шкіри, особливо тим, хто шукає глибоке очищення без пошкодження природного бар'єру шкіри.

Найкраща форма випуску ліпази в складі косметичних засобів – очищувальний гель. Це пояснюється тим, що він забезпечує глибоке очищення, оскільки завдяки своїй гелевій консистенції, здатний глибше проникати в пори, розчиняючи жири, забруднення та залишки макіяжу. У порівнянні з пінками або кремівими засобами, які здебільшого очищують поверхню шкіри, гель забезпечує більш ефективне очищення, особливо для жирної та комбінованої шкіри.

Очисний гель має мінімальну кількість подразників, легку текстуру, що

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання очищувального гелю з ліпазою у складі	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>					64	95
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>						64
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						
						Кафедра БТМ		

зазвичай менш подразнює шкіру, ніж кремові засоби, які можуть містити більше олій або жирних компонентів. Це робить гелі особливо привабливими для людей з чутливою шкірою.

Також очисні гелі дуже зручні в застосуванні, оскільки гелева текстура дозволяє легко контролювати кількість продукту, необхідну для одного застосування. На відмінну від рідких пінок, які можуть швидко витікати з упаковки, або кремових засобів, які важче рівномірно розподілити, гель лягає рівномірно на шкіру і легко змивається водою. (Mr Scrubber)

Враховуючи все вище сказане, мною було обрано, з усіх косметичних засобів, виготовляти очищувальний гель з ліпазою і складі.

Товарна форма очищувального гелю – це поєднання гелевої текстури, зручної упаковки різних об'ємів, а також маркетингової інформації на етикетці.

Очищувальний гель зазвичай має легку, прозору або напівпрозору консистенцію. Він не надто рідкий щоб розтікатися, і водночас не надто густий, що полегшує його нанесення і змивання.

Туба для пакування очищувального гелю має ряд переваг у порівнянні з іншими варіантами упаковки, такими як флакони з помпою, банки або пляшки. Перш за все перевагою є гігієнічність. Туба мінімізує контакт продукту з повітрям і руками, що зменшує ризик забруднення бактеріями, на відміну від банок, які вимагають занурення пальців або використання лопатки, що збільшує ризик занесення мікроб.

Економічність також є однією з переваг використання туб. Завдяки своїй гнучкості, тубу можна згорнути або стиснути, щоб використати весь продукт до кінця, мінімізуючи витрати. У флаконах з помпою частина продукту може залишатися всередині і бути недоступною для використання через обмеження помпової системи. Також туби більш зручні у використанні, їх легко і зручно транспортувати під час подорожей та при щоденному використанні, на відміну від флаконів з помпою, які є важчими та громіздкими.

Туби добре захищають продукт від повітря, світла, вологи. Матеріал використовують непрозорий, щоб захистити активні інгредієнти, зокрема ліпазу. Також вони більш дешевші у виробництві, ніж флакони з помпами, що дозволить

зменшити загальну вартість продукту. (Yangoli) Тому, найкраща товарна форма очищувального гелю з ліпазою у складі – туба.

6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання очищувального гелю

Одержання очищувального гелю з ліпазою у складі потребує ретельного підбору технологічних параметрів, оскільки ліпаза є активним ферментом, чутливим до температури, хімічних та механічних впливів. Тому, для забезпечення стабільності та ефективності ензиму у складі гелю, необхідно врахувати багато різних чинників.

У виробництві косметичних гелів застосовується широкий спектр основ, що забезпечуються структуроутворювачами та допоміжними речовинами, які утворюють оптимальні реологічні властивості, стабільність під час транспортування та зберігання. При виборі гелевої основи ключову роль відіграють дисперсність активного вмісту та його фізико-хімічні характеристики. Важливі значення мають також спосіб введення ліпази, порядок і швидкість змішування компонентів, час і температурний режим. Суттєво впливають на технологічні параметри процесу такі чинники: консистенція, реологічні властивості, однорідність, стабільність та ефективність готового гелю. (Роїк О. М. & Нікітіна О. М., 2024)

На основі аналізу наукової літератури я обрала гелеутворювач, який допомагає створювати м'які форми засобу — ксантанову камедь. Ця речовина відзначається швидким змочуванням і набуханням без потреби інтенсивного перемішування, що сприяє досягненню високої в'язкості. Ксантанова камедь забезпечує утворення прозорих гелів, що робить її особливо зручною та ефективною для використання в промислових умовах. (Роїк О. М. & Нікітіна О. М., 2024)

Технологічні особливості використання поверхнево-активних речовин (ПАР) при виробництві зумовлені їхньою здатністю покращувати розчинність ліпази в водних розчинах та підвищувати її активність. Дія ПАР пов'язана зі зменшенням поверхневого натягу між компонентами (шкірою та забрудненням), що допомагає ліпазі проникати у структуру жирових або білкових забруднень та

сприяти їх розщепленню. Виходячи з вище сказаного, мною були обрані кокамідопропілбетаїн та децил глюкозид. Вони є м'якими та ніжними до поверхні шкіри, добре взаємодіють з іншими інгредієнтами, покращують пінливі властивості, додатково звожують та зменшують подразнення шкіри. (Ткаченко Г. М. & Перцев І. М., 2002)

При розробленні гелевих продуктів потрібно також звернути увагу на ексципієнти, які здатні змінювати фізико-хімічні характеристики засобу. Зазвичай це антиоксиданти та антимікробні консерванти. Консерванти мають гарантувати мікробіологічну чистоту протягом усього їх проміжку застосування, тобто мати надійну антимікробну активність, а також бути сумісними з ліпазою та іншими компонентами. На сьогодні, вибір антимікробних консервантів, що допустимі до використання, є достатньо широким, однак при виготовленні косметичних гелів, виробники, в основному, надають перевагу парабенам (ніпагін, ніпазол), сорбіновій кислоті та її солям, бензойній кислоті та її солям, феноксіетанолу. Додавання до гелю останнього, практично не змінює його структурну в'язкість, але підвищує осмотичну активність і активність ліпази, тому й було обрано його. (Роїк О. М. & Нікітіна О. М., 2024)

Ліпаза є білковим ферментом, і її активність може знижуватися також під впливом кислотних чи лужних середовищ. Тому важливо вибрати умови для її інтеграції у гель так, щоб фермент не втратив своєї активності. Найкраще застосовувати рН близький до нейтрального (рН 6-7), а також використовувати стабілізатори, такі як гліцерин, для збереження структури ліпази. (Ткаченко Г. М. & Перцев І. М., 2002)

Метод приготування гелю для вмивання також є не мало важливим. Технологія включає етапи змішування компонентів гелю з ліпазою у складі при низьких температурах, щоб запобігти денатурації ферменту. Ензим додається після основних компонентів засобу, для того щоб уникнути її впливу на структуру гелю на ранніх етапах. (Ткаченко Г. М. & Перцев І. М., 2002)

Також після виробництва очищувального гелю з ліпазою важливо здійснити контроль активності ліпази та визначити її ліполітичну активність. Це дасть

підтвердження, що ензим залишився активним і здатен виконувати свою функцію в складі гелю.

Тож мною запропоновано очищувальний гель такого складу:

- Вода (75%) та ксантанова камедь (1%) – водна основа гелю;
- Кокамідопропілбетаїн (8%) та децил глюкозид (5%) – поверхнево-активна фаза гелю;
- Ліпаза (1%) – активний інгредієнт, очисна функція;
- Гліцерин (5%) – зволожувач, пом'якшувач, як стабілізатор;
- Пантенол (3%) – заспокійливий ефект, відновлення та загоєння;
- Феноксіетанол (1%) – консервант;
- Вітамін Е (0,5%) – потужний антиоксидант.

6.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва очищувального гелю

За одну партію пропоную виготовляти 50 л очищувального гелю для вмивання, тобто 200 тубиків. Матеріальний баланс розраховано в *табл 6.3.1.*

Таблиця 6.3.1.

Матеріальний баланс на одну серію очищувального гелю

№ з/п	Використано			Отримано	
	Назва сировини/напівпродукту	Відсоток в гелі (%)	Кількість (л,кг)	Втрати (%)	Кількість (л)
1	2	3	4	5	6
1. Підготовка водної основи					
1.1.	Вода	75	37,5	2,8 (7%)	37,2
1.2.	Ксантанова камедь	1	0,5		
2. Підготовка поверхнево-активної фази					
2.1.	Кокамідопропілбетаїн	8	4	0,45 (7%)	6,05
2.2.	Децил глюкозид	5	2,5		
3. Змішування водної та поверхнево-активної фаз					
3.1.	Водна основа	-	37,2	2,2 (5%)	41
3.2.	Поверхнево-активна фаза	-	6,05		
4. Додавання активних інгредієнтів					
4.1.	Гелева основа	-	41	0,9 (2%)	44,8
4.2.	Гліцерин	5	2,5		
4.3.	Пантенол	3	1,5		

4.4.	Вітамін Е	0,5	0,25		
4.5.	Ліпаза	1	0,5		
5. Консервування					
5.1.	Гель	-	44,8	0,45	44,85
5.2.	Фкноксіетанол	1	0,5	(1%)	
6. Фасування гелю в туби					
6.1.	Готовий гель		44,85	1,3 (3%)	43 туби
6.2.	Туби	-	50		

6.4. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання для виробництва очищувального гелю з ліпазою у складі наведена у табл. 6.4.1.

Таблиця 6.4.1.

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічні характеристики (виробник)
1	2	3	4
З-1	Збірник для виготовлення водної основи	1	Збірник об'ємом 60 л. («Промвіт»). Матеріал - нержавіюча сталь; тиск – від 1 до 3 бар; оснащений мішалкою, датчиками температури і тиску. Габаритні розміри, мм: 90x60x120. (Промвіт)
Д-2	Дозатор для подачі води дистильованої	1	Дозатор рідини та води mBev. Об'єм дозуючої води: від 0,1 до 999,9 л; витрати води: від 0 до 10 л/хв. (mBev)
Н-3	Кулачковий насос для перекачування водної основи	1	Кулачковий насос («YUY»). Продуктивність - 1,5 м ³ /год; потужність – 0,55 кВт; привод – електричний. Габаритні розміри, мм: 40x15x20. (prom-nasos)
З-4	Збірник для виготовлення поверхнево-активної фази	1	Збірник на 10 л («Титан технікс»). Матеріал – високоякісне боросилікатне скло; оснащений сорочкою, мішалкою з швидкістю обертання - 0 – 680 об/хв; потужність переміщення – 90 Вт. Габаритні розміри, мм: 30x20x30. (prom,5)

З-5	Збірник для змішування всіх компонентів гелю	1	Збірник на 80 л («Титан технікс»). Матеріал – високоякісне боросилікатне скло; оснащений сорочкою, мішалкою з швидкістю обертання - 0 – 680 об/хв; потужність перемішування – 200 Вт; робоча температура – від -120°C до +300°C. Габаритні розміри, мм: 100x70x130. (prom,6)
АУ-6	Автоматична установка для фасування очищувального гелю в туби	1	Автомат для фасування в туби («Інтермаш»). Продуктивність – до 30 уп/хв; обсяг дози – 10 – 250 мл; тиск – 0,6 МПа; потужність – 3,5 кВт. Габаритні розміри, мм: 1400x1200x1800. (Інтермаш)

6.5. Опис технологічної схеми отримання очищувального гелю

Технологічна та апаратурна схема одержання очищувального гелю з ліпазою у складі наведена у технологічній частині роботи.

ТП 1. Підготовка водної основи

В збірник (З-1) на 60 літрів через об'ємний дозатор (Д-2) подають 37,5 л води дистильованої та нагрівають до температури 70°C. Далі додають 0,5 кг порошку ксантанової камеді, зваженого на технічних терезах, та постійно перемішують для уникнення грудочок. Перемішування здійснюють ще 15 хвилин доки не утвориться гелеподібна консистенція.

ТП 2. Підготовка поверхнево-активної фази

В збірник (З-4) на 10 л додають 4 л кокамідопропілбетаїну та 2,5 л децил глюкозиду та перемішують до отримання однорідної суміші. Для кращої інтеграції суміш підігрівають до 45°C.

ТП 3. Змішування водної та поверхнево-активної фази

В збірник (З-5) на 80 літрів перекачують кулачковим насосом (Н-3) 38 л водної основи з збірника (З-1). Туди ж з збірника (З-4) самоплином поступово подають 6,5 л поверхнево-активної фази, повільно перемішуючи. Перемішування здійснюють ще 20 хвилин доки не утвориться однорідна суміш.

ТП 4. Додавання активних інгредієнтів

В збірнику (З-5) остужають суміш до температури не вище 30°C та додають 2,5 л гліцерину, 1,5 л пантенолу, 0,25 л вітаміну Е та ретельно перемішують 20 хв. Далі знову остужають суміш до температури не вище 30°C та додають 0,5 кг ліпази та обережно перемішують.

ТП 5. Консервування

Після того як всі інгредієнти змішані і охолоджені у реактор (Р-5) додають 0,5 л феноксіетанолу та ретельно перемішують продукт 10 хвилин для рівномірного розподілу. Контролюють рН гелю, яке повинно становити 5,5.

ПМФ 6 Фасування гелю в туби

Готовий гель за допомогою автоматичної установки (АУ-6) фасують в туби по 250 мл та відправляють на склад на зберігання

РОЗДІЛ 7

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Згідно науково-технічної документації, потрібним є забезпечення контролю кожного етапу одержання мікробної ліпази, а також контролю готової субстанції та продукції. Це робиться для того, щоб упевнитися у відповідності готової продукції вимогам.

Таблиця 7.1.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник до визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
<i>Технологічний процес отримання порошку ліпази</i>				
Кт 1.2. Очищення від грубих домішок повітря	Повітря; Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря у фільтрі грубого очищення	E=80-90%
Кт 1.3. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря; Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря в головному фільтрі	E=95%
Кт 1.4. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря; Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Після проходження повітря в індивідуальному фільтрі	E=99,999%

					НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ							
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва							
Розроб.	Тролпак В.Ю									Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О									72	95	72
Н. Контр.										Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П											

Кт 1.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря; термометр	Термометр	Після нагрівання	$t = 60^{\circ}\text{C}$
Кх 2 Підготовка натрій фосфатно- цитратного буферу	Розчин натрій цитратно- фосфатний; концентрація; рН	Мірний циліндр, датчик рН	Концентрація та рН контролюється на етапі приготування розчину	$W = 10 \text{ мМ};$ $\text{pH} = 5$
Кх 2 Підготовка трис- НСІ буферу	Розчин трис- НСІ буферу; концентрація; рН	Мірний циліндр, датчик рН	Концентрація та рН контролюється на етапі приготування розчину	$W = 10 \text{ мМ};$ $\text{pH} = 8,0$
Кт 4 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина; температура	Термометр	Температура контролюється кожну годину	$t = 4^{\circ}\text{C}$
Кт 5 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина; частота обертів, час	Годинник, датчик обертів	Під час процесу центрифугува- ння	$n = 8000$ об/хв; $t = 20 \text{ хв}$
Кт 6 Концентрування супернатанту	Супернатант; Режим фільтрації	Манометр для вимірювання тиску до і після фільтрації	Під час процесу ультрафільтрації	Незмін- ність показників тонометра
Кт 7 Осадження ліпази сульфатом амонію	Концентрат; оберти мішалки, час перемішування, час осадження, температура	Датчик обертів, годинник, термометр	Під час процесу осадження	$n = 100$ об/хв; $T_{\text{перем}} =$ 20 хв $T_{\text{осадж.}} = 2$ год; $t = 4^{\circ}\text{C}$
Кт 8 Відокремлення осаду ліпази центрифугуванням	Суспензія; частота обертів, час	Годинник, датчик обертів	Під час процесу центрифугува- ння	$n = 14000$ об/хв; $t = 20$ хв

Кт 9 Резуспендування осаду	Суспендований осад ліпази; температура; частота обертів; час	Термометр; частота обертів; годинник	Під час процесу ресуспендіва- ння	$t=4^{\circ}\text{C}$; $n=100$ об/хв; $T=20$ хв
Кт, Кх 10 Іонообмінна хроматографія	Розчин ліпази; швидкість потoku, рН	Датчик руху рідини, датчик рН	Під час процесу іонообмінної хроматографії	$V = 1$ мл/хв; $\text{pH}(\text{буфера})$ $= 7,0 - 7,5$
Кт 11 Ультрафільтрація	Високоочищений розчин ліпази; Режим фільтрації	Манометр для вимірювання тиску до і після фільтрації	Під час процесу ультрафільт- рації	Незмін- ність показників тонометра
Кт 12 Сушіння в розпилюючій сушарці	Очищена ліпаза, нагріте повітря; Температура повітря початкова, температура кінцева, вологість	Термометр, гігрометр	Під час процесу висушування	$T = 1$ год; t $= 60^{\circ}\text{C}$; $\Phi =$ 5%
Кт 13 Фасування ліпази в баночки	Порошок ліпази, баночки; температура	Термометр	Під час процесу фасування	$t = 25^{\circ}\text{C}$
<i>Технологічний процес отримання очищувального гелю з ліпазою у складі</i>				
Кт 1 Підготовка водної основи	Водна фаза; температура, кількість обертів, тривалість	Термометр, частота обертів, годинник	Під час процесу	$t=70^{\circ}\text{C}$; $n=500$ об/хв; $T=15$ хв
КТ 2 Підготовка поверхнево- активної фази	Поверхнево- активна фаза; температура, кількість обертів, тривалість	Термометр, частота обертів, годинник	Під час процесу	$t=45^{\circ}\text{C}$; $n=300$ об/хв; $T=10$ хв
Кт 3 Змішування водної та поверхнево- активної фаз	Основа гелю; кількість обертів, тривалість	Частота обертів, годинник	Під час процесу	$n=300$ об/хв; $T=20$ хв

Кт 4 Додавання активних інгредієнтів	Гель; температура, кількість обертів, тривалість	Термометр, частота обертів, годинник	Під час процесу	t=30°C; п=200 об/хв; T=20 хв
Кт, Кх 5 Консервування	Гель; кількість обертів, тривалість, кислотність	Частота обертів, годинник, рН-метр	Кількість обертів, тривалість – під час процесу; кислотність – після процесу	п=200 об/хв; T=10 хв; рН=5,5
Кт Фасування гелю в туби	Гель, туби; температура, об'єм	Термометр, датчик контролю доз	Під час процесу	t=20-25°C; V=250мл

7.1. Підбір сучасних методів контролю порошку мікробної ліпази

Напівпродукт – порошок мікробної ліпази контролюють за такими показниками:

- Активність ліпази
- рН
- визначення вологості
- мікробіологічна чистота

Визначення активності ліпази

Ліполітичну активність вимірювали з використанням спектрофотометричного аналізу із застосуванням PNPP (паранітрофенілпальмітату) як субстрат. Реакційна суміш містила 0,1 мл ферментного екстракту, 0,8 мл 0,05 М Трис-буферу (рН 8) і 0,1 мл 0,01 М PNPP, розчиненого в ізопропанолі. Реакційну суміш видержували за температури 60°C протягом 20 хвилин на водяній бані та додатково додавали 0,25 мл 0,1 М Na₂CO₃, щоб зупинити реакцію. Далі її центрифугували за 11000 обертів за хвилину протягом 15 хвилин і вимірювали оптичну густину при 410 нм. Одна одиниця

активності ліпази була визначена як кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль п-нітрофенолу за хвилину із п-нітрофенілпальмітату. (Tripathi R. та ін., 2014)

Активність готового порошку має бути 473 од/г.

Визначення рН

Апаратура. рН-метр з точністю вимірювання від 0,01 од. рН; звичайне лабораторне устаткування (посудина, скляна паличка).

Проведення іспиту. У мензурку ємністю 150 мл зважували 5г порошку ліпази з точність до 0,01г і доводили водою до позначки 100. Перемішували, щоб краще розчинився порошок. Таких зразків готують два.

Спочатку потрібно промити електроди рН-метра водою, а далі - невеликою кількістю досліджуваного нами зразка. Зануріть електроди в перший зразок розчину і повільно перемішайте його та зафіксуєте результат. Потім видаліть електроди та промийте у незначній кількості розчину другого зразка. Зануріть електроди в другий зразок та повторіть так само вимірювання.

Якщо різниця між двома вимірюваннями перевищує 0,1 рН, повторіть тестування. У разі, якщо розбіжність залишається, перевірте стан електродів рН-метра.

Усі виміри рН здійснюють за температури 20 - 25°C.

рН ліпази повинен бути 6,5 – 7,5.

Визначення вологості

Визначення вологості після сушіння проводять за допомогою аналізатора вологості.

Принцип визначення вологості. Зразок порошку розміщують у сушильній камері для визначення втрати маси до і після висушування. Процес триває доти, доки маса зразка не залишається стабільною і не змінюється при подальшому нагріванні. Аналізатор вологості оснащений системою калібрування маси тари, що забезпечує високу точність вимірювань. Маса речовини для аналізу повинна бути в межах від 50 до 200 грам

Діапазон вимірювання вологості становить від 0 до 100%. Відносна точність визначення вмісту вологості становить приблизно 0,01%. Час, необхідний для проведення експрес-аналізу від 1 до 60 секунд. (Білинський Й. Й. & Скалецька М. О., 2023)

Вологість сухого ферментного препарату повинна становити 10-12%.

Визначення мікробіологічної чистоти

Мікробіологічну чистоту порошку ліпази можна визначити за допомогою флуорисцентної мікроскопії. Цей метод ґрунтується на використанні флуорисцентних барвників, що вибірково зв'язуються із нуклеїновими кислотами, що дозволяє візуалізувати їх під флуорисцентним мікроскопом.

Проведення іспиту. Візьміть невелику кількість порошку ліпази (приблизно 10 – 50 мг). Розчиніть у стерильному фосфатно-сольовому буфері. Краплю одержаного розчину помістіть на предметне скло і дайте зразку висохнути.

Після цього, додайте декілька крапель барвнику DAPI (4',6-діамідино-2-феніліндол) і відкладіть на 15 хвилин за кімнатної температури в темряві. Далі акуратно промийте зразок дистильованою водою для того, щоб видалити надлишок барвника та накрійте покривним скельцем.

Далі подивіться зразок під флуорисцентним мікроскопом (даний барвник зв'язується із ДНК і фарбує ядра клітин у блакитний колір під ультрафіолетовим світлом). Порахуйте число світящихся точок, які і відповідають кількості мікроорганізмів. (Veal D. A. та ін., 2020)

7.2. Методи контролю очищувального гелю з ліпазою у складі

Відбирання проб, готування до випробувань проводять згідно з ДСТ ISO 24156:2015.

Консистенцію, смак і запах визначають органолептично; колір, якість пакування і маркування перевіряють візуально. Гель має однорідну, густу, вязку консистенцію; без смаку і запаху, прозорий.

Поверхневий натяг гелю визначають за допомогою методу статичної краплі. (Методичні вказівки, 2018)

За допомогою мікропіпетки розподіляють маленьку краплю гелю на горизонтальну поверхню і визначають її діаметр з використанням лінійки або мікрометра. Потім встановлюють масу краплі, зваживши її на вагах та визначають за формулою:

$$\gamma = \frac{F}{L}$$

де: F – сила, що визначається масою краплі (маса краплі x гравітаційне прискорення);

L – довжина лінії, яка охоплює межі краплі (довжина периметра краплі)

В'язкість гелю встановлюють з використанням ротаційного віскозиметра. (Борисенко В. Г., 2010)

Віскозиметр встановлюють відповідно до інструкції виробника і заповнюють його гелем до рекомендованого рівня. Запускають його, вибравши потрібну швидкість обертання. Знімають показники в'язкості (в мПас) за різних швидкостях обертання. Записують значення і будують графік залежності в'язкості від швидкості обертання.

Визначення активності ліпази спектрофотометричним методом. (Борисенко А. В. та ін., 2011)

Ліполітичну активність (ЛП) визначають спектрофотометричним методом, який ґрунтується на дії ліпази на хромогенний субстрат – фенольний ефір пальмітинової кислоти із вивільненням у результаті реакції п-нітрофенолу (пНФ), який призводить до зміни оптичної густини реакційної суміші. В даній реакції емульгатором слугує дезоксихолат натрію, захисним колоїдом – гуміарабік.

Значення ліполітичної активності розраховують за формулою (за одиницю активності приймають таку кількість ензиму, який каталізує вивільнення 1 моль н-нітрофенолу із емульгованого субстрату за 1 хв при 37°C):

$$ЛА = \frac{\Delta E \cdot V1}{e \cdot d \cdot V2}$$

де, ЛА – ліполітична активність, нмоль/хв мл

ΔE – зміна величини екстенції за 1 хв

V_1 – загальний об'єм реакційної суміші, мл

ϵ – коефіцієнт екстинції п-нітрофенолу при зазначених умовах

$\epsilon = 0,015$ нмоль; $d = 0,5$ см

V_2 – об'єм проби ферменту для реакції, мл; $V = 10.1$ мл

Визначення рН гелю проводять за допомогою рН-метра

У мензурку ємністю 150 мл зважували 5г порошку ліпази з точністю до 0,01г і доводили водою до позначки 100. Перемішували, щоб краще розчинився порошок. Таких зразків готують два.

Спочатку потрібно промити електроди рН-метра водою, а далі - невеликою кількістю досліджуваного нами зразка. Зануріть електроди в перший зразок розчину і повільно перемішайте його та зафіксуйте результат. Потім видаліть електроди та промийте у незначній кількості розчину другого зразка. Зануріть електроди в другий зразок та повторіть так само вимірювання.

Якщо різниця між двома вимірюваннями перевищує 0,1 рН, повторіть тестування. У разі, якщо розбіжність залишається, перевірте стан електродів рН-метра.

Усі виміри рН здійснюють за температури 20 - 25°C.

рН гелю повинен бути 6,5.

Густина гелю визначають за допомогою аерометра

Гель поміщають у чистий мірний циліндр. Далі обережно (не торкаючись стінок циліндра) в нього занурюють аерометр. Зчитують показник на шкалі аерометра на рівні поверхні гелю. Дослід проводять як мінімум на двох пробах.

РОЗДІЛ 8

ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСТНУ МОДЕЛЬ

В даному розділі мною була розроблена патентна заявка на спосіб отримання ліпази.

Галузь і застосування корисної моделі

Ця корисна модель належить до галузі біотехнології, зокрема до методів отримання ферментів з використанням генетично модифікованих мікроорганізмів. Конкретно, вона стосується виробництва через мікробіологічні процеси ліпази, ферменту, що каталізує гідроліз жирів.

Отримані ліпази можуть бути використані в різних галузях промисловості, включаючи косметичну, фармацевтичну, харчову та побутову хімію. Нижче наведено приклади застосування у кожній з цих галузей:

1. Косметична промисловість:

- Креми та лосьйони: Ліпази можуть додаватися до кремів і лосьйонів для поліпшення їх зволожувальних і очищувальних властивостей. Ліпази допомагають розщеплювати жири на поверхні шкіри, сприяючи глибокому очищенню і поліпшенню текстури шкіри.

- Шампуні та кондиціонери: Використання ліпаз у шампунях і кондиціонерах сприяє глибокому очищенню волосся та шкіри голови, видаляючи надлишок себуму і забруднення.

- Антивікові засоби: Ліпази можуть бути включені до складу антивікових засобів для покращення еластичності шкіри та зменшення зморшок.

2. Фармацевтична промисловість:

- Ліпаза як дієтична добавка: Ліпази можуть використовуватися у складі дієтичних добавок для покращення травлення жирів у пацієнтів з недостатністю підшлункової залози.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на користну модель	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Тромпак В.Ю</i>					80	95
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О</i>						80
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П</i>						
						Кафедра БТМ		

- Засоби для лікування шкірних захворювань: Ліпази можуть бути компонентами мазей і кремів для лікування шкірних захворювань, пов'язаних з порушенням ліпідного обміну.

3. Харчова промисловість:

- Обробка жирів: Ліпази використовуються для модифікації жирів у харчових продуктах, таких як молочні продукти, м'ясо і кондитерські вироби, для поліпшення їх смакових якостей і текстури.

- Виробництво ароматизаторів: Ліпази можуть застосовуватися для створення специфічних ароматів і смаків у харчових продуктах шляхом розщеплення тригліцеридів.

4. Побутова хімія:

- Засоби для чищення: Ліпази можуть бути компонентами пральних порошків і засобів для миття посуду, допомагаючи ефективно видаляти жирові забруднення.

Відомі аналоги та їх основні недоліки

Відомі і аналогічні способи отримання ліпази. Генно-модифіковані бактерії *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 вирощували у рідкому поживному середовищі з використанням пептону, як джерело нітрогену, та сахарози, як джерело карбону, та з обов'язковою присутністю Ca^{2+} і Mg^{2+} . Культивування проводили за температури 45°C , $\text{pH} = 7$ і застосуванням аерації 220 об/хв. В якості індуктора застосовували твін-20 та 80. Після 72 год культивування вихід продукту становив 99,9 Од/мл ліпази. (Haniya Mazha та ін., 2017)

Недоліками даного способу культивування є низький вихід продукту (99,9 Од/мл ліпази), а також довгий час культивування (72 год).

Іншим відомим аналогічним способом отримання ліпази є вирощування грибів *Aspergillus terreus* NCFT 4269. Дані гриби вирощували за поверхневого способу культивування з використанням пальмової олії, як джерела Карбону. Культивування проводили за температури $28 - 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$. Після 96 годин культивування вихід ліпази становив 1366 Од/мл. (Kumar S. B. та ін., 2016)

Недоліками даного способу культивування є низький вихід продукту (1366 Од/мл ліпази), довгий час культивування (96 год), а також поверхневий спосіб культивування за якого важче контролювати умови, збільшує ризик контамінації та не дозволяє автоматизувати процес виробництва.

Іншим відомим аналогічним способом отримання ліпази є вирощування бактерій *Serratia mercrescens* B-10 L-1. Дані бактерії вирощували на качалках зі струшуванням при температурі 28-30°C, рН 4,5 – 5,5 протягом 180 год. Використовували середовищі YNB із додаванням глюкози (5 мас. %), оливкової олії (5 мас. %) і сечовини (0,8 мас. %). Вихід ліпази становив 180 Од/мл. (Дехтяренко Н. В. & Пєскова Л.О., 2014)

Недоліками даного способу культивування є низький вихід продукту (180 Од/мл ліпази), а також довгий час культивування (180 год).

Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

Існує необхідність у розробці ефективного та економічно вигідного способу отримання ліпази з високою активністю та стабільністю для використання у різних галузях промисловості, включаючи косметичну, фармацевтичну, харчову та побутову хімію. Традиційні методи виробництва ліпази, такі як екстракція з тваринних або рослинних джерел, мають ряд обмежень, включаючи низьку продуктивність, складність очищення та можливі екологічні проблеми.

Основними проблемами, які необхідно вирішити, є:

- Висока продуктивність. Необхідно збільшити вихід ліпази для задоволення промислових потреб.
- Чистота та стабільність. Отриманий фермент повинен мати високу чистоту і стабільність для забезпечення його ефективності у різних застосуваннях.
- Економічність. Процес виробництва повинен бути економічно вигідним, з мінімальними витратами на матеріали і енергію.
- Екологічна безпека. Процес повинен бути екологічно чистим, з мінімальним впливом на навколишнє середовище.

Для вирішення вищезазначених проблем було розроблено новий спосіб отримання ліпази з використанням генетично модифікованих мікроорганізмів.

Цей спосіб включає вибір штаму мікроорганізму, який легко трансформується та має високий рівень експресії чужорідних генів та введення в штам мікроорганізму плазміди, що містить ген ліпази (pET21a-lipA) з сильним промотором для забезпечення високого рівня продукції ліпази. Вирощування генетично модифікованих мікроорганізмів у поживному середовищі, що містить необхідні для їх росту компоненти, при оптимальних умовах температури, рН та аерації. Індукція вироблення ліпази шляхом додавання індуктора, такого як IPTG, у відповідний момент культивування.

Опис запропонованого способу

В новому винаході використовуються бактерії *Escherichia coli*, трансформовані плазмідною, що містить ген ліпази (pET21a-lipA). Плазміда вводиться у клітини *E. coli* методом електропорації. Трансформовані *E. coli* вирощуються у рідкому середовищі, що містить поживні речовини (лізогенний бульйон (LB) з додаванням 1% глюкози). Культивування проводиться при температурі 37°C, рН = 6,5 протягом 24 год. Застосовується інтенсивна аерація з обертанням при 200 об/хв. Додатково додається ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиду (IPTG) у концентрації 1 мМ для індукції експресії гена ліпази. Час індукції 6-8 годин при температурі 30°C. За таких умов генно-інженерний штам здатен синтезувати 9000 Од/мл ліпази.

Формула корисної моделі

1. Спосіб отримання ліпази, який включає трансформацію штаму мікроорганізмовою плазмідною, що містить ген ліпази; культивування трансформованого штаму мікроорганізму у поживному середовищі; індукцію вироблення ліпази шляхом додавання індуктора та відрізняється тим, що штам мікроорганізму вибирають *Escherichia coli* та генно-модифікують його за допомогою плазміди, що містить ген експресії ліпази та включає сильний промотор для забезпечення високого рівня ліпази.

2. Спосіб з п. 1, який відрізняється тим, що культивування трансформованого штаму мікроорганізму проводять при температурі 36 - 38°C і рН 6,0-7,0.

3. Спосіб з п. 1, який відрізняється тим, що індуктором для індукції виробництва ліпази є ізопропіл- β -D-тіогалакто-піранозид (IPTG).

4. Спосіб з п. 1, який відрізняється тим, що вихід ліпази становить 9000 Од/мл, що є дуже високим.

Реферат

Спосіб отримання ліпази

Винахід відноситься до біотехнологічної промисловості і може бути використаний у виробництві ліпази для косметичної, харчової, фармацевтичної, хімічної галузі.

Спосіб отримання ліпази біотехнологічним шляхом, що передбачає використання бактерії *Escherichia coli*, трансформованих плазмідною, що містить ген ліпази (pET21a-lipA). Плазмідна вводиться у клітини *E. coli* методом електропорації. Трансформовані *E. coli* вирощуються у рідкому середовищі, що містить поживні речовини (лізогенний бульйон (LB) з додаванням 1% глюкози). Культивування проводиться при температурі 37°C, рН = 6,5 протягом 24 год. Застосовується інтенсивна аерація з обертанням при 200 об/хв. Додатково додається ізопропіл- β -D-тіогалакто-піранозиду (IPTG) у концентрації 1 мМ для індукції експресії гена ліпази. Час індукції 6-8 годин при температурі 30°C. За таких умов генно-інженерний штам здатен синтезувати 9000 Од/мл ліпази.

Такий спосіб дозволяє отримати високий вихід продукту ліпази за короткий період вирощування мікроорганізмів, за рахунок проведення генетичних маніпуляцій з ним.

ВИСНОВКИ

1. Мікробні ферменти активно застосовуються в косметології, оскільки дуже добре очищають шкіру (ліпази), омолоджують її (гіалуронідаза), захищають від пошкоджень (каталаза, супероксиддисмутаза), а також дуже корисні в догляді за волоссям (кератиназа).

2. Одержання ферментів біотехнологічним шляхом має багато переваг: висока продуктивність, економічність, можливість використання методів генної інженерії. Також мікробні ензими є більш стабільними та працюють у широкому діапазоні активності.

3. Згідно статистики потреба в ліпазі для виробництва очищувального гелю становить 41172 кг. Однак, оскільки більшість косметичної продукції на ринку є закордонною, а також той факт що не всі гелі містять ліпазу, то було запропоновано виробляти ліпазу для задоволення 10% потреби. Провівши розрахунки, та врахувавши всі деталі, потрібно виготовляти 33,1 м³ культуральної рідини за цикл.

4. Ліпазу для застосування в косметології нам потрібно отримувати в високоочищеному стані у вигляді порошку. Тому було обрано перший етап очищення – осадження сульфатом амонію з наступним більш тонким очищенням – іонообмінною хроматографією та висушування в рошпилюючій сушці, для отримання порошку.

5. Було запропоновано унікальну формулу очищувального гелю з ліпазою у складі та запропоновано технологію її виготовлення. Даний продукт добре глибоко очищає шкіру, додатково зволожує та не подразнює.

6. Основним методом контролю є визначення активності ліпази за допомогою спектрофотометрії. Також здійснюють вимірювання рН, мікробіологічну чистоту та вологість порошку. Готовий гель перевіряють додатково на в'язкість, поверхневий натяг, густину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Abed L., Kargar M., Karimi Z., Ghasemi Y. (2013). Optimization of cultural conditions for production of hyaluronidase by *Bacillus sp.* LA_04. *Research in Pharmaceutical Sciens.* 7(5): 358-370.

Adrio J. L. & Demain A. L. (2017). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules.* 4(1):117 – 139.

Akshita M., Urgyn B., Reena G. (2017). Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research.* 8: 58 – 77.

Ali S., Afzar Khan S., Hamayun M., Lee I. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms.* 11(2): 510 – 528.

Alpix. Круглі вентиляційні шахти SP. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://alpix.com.ua/catalog/lindab/vozdukhoraspredelenie-i-regulirovanie-vozdukha/ventilyatsionnye-shakhty/kruglye-ventilyatsionnye-shakhty-sp/>

Amery. 2015. Ліпаза в косметології. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://cosmetic.ua/lipaza_v_kosmetike

Anbu P. (2016). Enhanced production and organic solvent stability of a protease from *Brevibacillus laterosporus* strain PAP04. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 49(4): 1-7.

AS Filter База фільтрів. Кишеньковий фільтр ФЯК F9 287x592x600-4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannyye-filtry/karmannyy-filtr-287kh592kh600-4-f9/>

Baghel V.S., Tripathi R.D., Ramteke R.W. and other. (2015). Psychrotrophic proteolytic bacteria from cold environments of Gangotri glacier, Westren Himalaya India. *Enzyme Microbial. Technol.* 36: 654–659.

Bharathi D. & Rajalakshmi G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 22: 1 – 21.

Chung H. T., Show P. L., Ooi C. W., Ng E and other. (2015). Novel lipase purification methods – a review of the latest developments. *Biotechnology Journal.* 10: 31 – 44.

Chenthamarakshan A., Parambayil N., Miziriya N. and other. (2017) Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. *BMC Biotechnology*. 17(12): 1-10.

Contesini F. J. (2017). Production, characterization and application of proteases from *Bacillus* sp. São Paulo, Brazil: School of Food Engineering, University of Campinas (Phd thesis). 41: 51 – 65.

DEBEM. Перистальтический насос МР-8. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-8/

Derhab N., Mabrouk M. E. M, El-Metwally M. M., Mohammed Y. M. M. (2023). Thermostable keratinase from *Bacillus cereus* L10: optimization and some potential biotechnological applications. *Biomass Conversion and Biorefnery*. 2: 1-17.

Dobrev G., Zhekova B., Dobрева V. and other. (2015). Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(1): 77 – 82.

Gaurav P., Anil P., Pavana J. V. P., Sayantan B. and other. (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 9: 50-55.

Gonçalves dos Santos Aguilar G & Harumi Sato H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*. 103: 253-262.

Gupta P. L., Rajput M., Oza T., Trivedi U., Sanghvi G. (2019). Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. *Natural Products and Bioprospecting*. 9: 267 – 278.

Haniya M., Naaz A., Sakhawat A. and other. (2017) Optimixed production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *Africal Journal of Biotechnology*. 16(19): 1106-1115.

Ioannou E. & Labrou E. N. (2022). Development of Enzyme-Based Cosmeceuticals: Studies on the Proteolytic Activity of *Arthrospira platensis* and Its Efficient Incorporation in a Hydrogel Formulation. *Cosmetics*. 9(5): 106 – 121.

Isaac G. S. & Abu-Tahon M. A. (2016). Dehairing capability of Alkaline Keratinase Produced by New Isolated *Cochliobolus hawaiiensis* AUMC 8606 Grown on Chicken Feather. *Romanian Biotechnological Letters*. 22(6): 12147 – 12154.

Jayakumar P., Gurusamy R., Sakthivel N. (2019). Microbiome of Rhizospheric Soil and Vermicompost and Their Applications in Soil Fertility, Pest and Pathogen Management for Sustainable Agriculture. *Soil Fertility Management for Sustainable Development*. 9: 189 – 210.

Javed S., Azeem F., Hussain S. and other. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 132: 23 – 34.

Kambourova M., Kirilova N., Mandeva R., Derekova A. (2018). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC. *J. Mol. Catal. B. Enzyme*. 7: 307 – 313.

Kuddus, M. & Ramteke, P.W. (2011). Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7: 809–816.

Kumar Sethi B., Kumari Nandab P., Sahoo S. (2016). Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. *Brazilian Journal of microbiology*. 47: 143-149.

Liu L., Qamar S. A., Bilal M., Iqbal H. M. N. (2021). Broadening the Catalytic Role of Enzymes in Cosmeceutical Sector: a Robust Tool from White Biotechnology. *Catalysis Letters*. 1- 13.

Macchione M. M., Merheb C. W., Gomes E and other. 2008. Protease production by different thermophilic fungi. *Appl Biochem Biotechnol*. 146: 223 – 230.

mBev. Дозатор рідини, води, молока, пива та інших напоїв за обсягом. Точний порційний розлив і дозування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://magnum-beer.com.ua/ua/p1493971053-dozator-zhidkosti-vody.html>

Merheb C. W., Cabral H., Gomes E and other. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus. *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem*. 104: 127 – 131.

Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M and other. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chem.* 120: 87 – 93.

Mohamed E. M., Hetta M. H., Rateb M. E. and other. (2020) Bioassay-Guided Isolation, Metabolic Profiling, and Docking Studies of Hyaluronidase Inhibitors from *Revenala madagascariensis*. *Molecules.* 25(7): 1714 – 1729.

Mr. Scruber. Гель для вмивання та його місце серед очищувальних засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mrscrubber.com/gel-dlja-umyvanija-i-ego-mesto-sredi-ochishhajushhih-sredstv/>

Neifar M., Chouchane H., Mahjoubi M., Jaouani A., Cherif A. (2016) *Pseudomonas extremorientalis* BU118: a new salt-tolerant laccase-secreting bacterium with biotechnological potential in textile azo dye decolourization. *3 Biotech.* 6: 107-116.

Patel A. K., Dong C., Chen C. and other. (2023). Chapter 3 – Production, purification, and application of microbial enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes (Second Edition).* 10: 25 – 57.

ProColsunting. Дослідження ринків. Аналіз ринку косметики в Україні. 2021 р. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/analiz-rynka-kosmetiki-v-ukraine-2021-god>

Prom,1 . Центрифуга з завантаженням 50 кг. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1433494913-tsentrifuga-zavantazhenyam.html?token=v2%3AAE52Rk-Ghte7O2pmFE0_yNhRF8u5QPK-FWhMAEkYwfMMuOQ2-tWrrxvP0R4864UFincRwDasD58bLcB_XpeUrrZ43ADAIO5gkdC-2EHTznZjKGXRQkSiVnng8KWOFy3&campaign_id=1090610&product_id=1433494913&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=uk&category_ids=282925&primelead=MC44NA&from_spa=true

Prom,2 . Реактор 300 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1016490435-reaktor-300->

litrov.html?srsltid=AfmBOooewk5-R4LOqSgL-zJ18A_e1dqgKB1rie3Tg11qvt-RvX4ez1pm

Prom,3. Система ультрафільтрації Toray UFS 572T-S. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://h2o.kharkov.ua/ua/p867246798-sistema-ultrafiltratsii-toray.html?srsltid=AfmBOooATsPNirLn6HmFM6yMPQPcRbbfM4zHvFiX6qDFMSCFeAeRpxLm>

Prom,4. Розпилювальна сушильна установка УРС-5 METALIS (5 кг по випарній вологі на годину) компактна сушарка. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1437382620-raspylitelnaya-sushilnaya-ustanovka.html?srsltid=AfmBOoqc4IHak1gyuXM0cr0iN1-8ntxNspjs2LfgL0j3AVdCK2vimPey>

Prom, 5. Titan techniks. Скляний реактор із сорочкою S212 об'єм 10 літрів, реакційний котел. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hms-ua.com/ua/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html>

Prom, 6. Titan techniks. Реакційний котел S212 об'єм 80л, змішувальний реактор. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hms-ua.com/ua/p1445432426-reaktsionnyj-kotel-s212.html>

Prom – насос. Lobe Pump RLP-Z-5L, AISI 316L, 0,55 kW, 380V 50HZ 3P насос для в'язких продуктів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom-nasos.com.ua/catalog/pumps-by-type/sanitary-hygienic-pumps/rlp-z-5l-aisi-316l-380v-50hz-3p-rotorniy-kulachkoviy-nasos/>

Простанки. Реактор емальований 15 м³. . [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.prostanki.com/board/item/324553>

Saxena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S. (2013). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*. 52(1): 1 – 18.

Seema M., Sharma S. C., Shailendra K. A. (2020). Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology Reports*. 25: 413-422.

Seki, T., Yajima, I., Yabu, T., Ooguri, M., Nakanishi, J. (2005) Examining an exfoliation-promoting enzyme for cosmetic applications. *Cosmet. Toilet*. 120: 87 – 99.

Sigma Ukraine. Насос відцентровий самовсмоктуючий 0,8 кВт Нmax 40 м Qmax 50 л/хв (нерж) LEO (775316). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrovezhnyy-samovsasyvayushchyy-leo-0-8kvt-hmax-40m-qmax-60l-min-nerzh-775316/>

Singh R., Kumar M., Mittal A., Kumar Mehta P. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. 6: 174 – 189.

Souza P., Bittencourt M., Caprara C., Freitas M. and other. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology. 46(2): 337 – 346.

Souza P. M., Werneck G., Aliakbarian B. and other. (2016). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. Food and Chemical Toxicology. 109(2): 1103 – 1110.

Sunar K., Kumar U., Deshmukh S.K. (2016). Recent Applications of Enzymes in Personal Care Products. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production. 12: 279 – 298.

Samar F., Amna F., Asia A., Faiz A. J., Aqsa P. (2020). Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques // *Biotechnol Appl Biochem*, 3: 487 - 499 doi: 10.1002/bab.2019.

Tanmay P., Suman K. H., Arpan D., Surojit B. and other. (2013) Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2(1): 50 – 57.

Tripathi R., Singh J., Bharti R., Thakur I. (2014). Isolation, Purification and Characterization of Lipase from *Microbacterium* sp. and its Application in Biodiesel Production. *Energy Procedia*. 54: 518 – 529.

Unilab. Laboratory equipment. Іонний хроматограф 940 Professional IC vario. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/Professional-IC-Vario/Ionnyykhromatograf940ProfessionalICvario/>

Qinghua Z., Zhixin S., Liangcheng J. (2020). High-Level Production of a Thermostable Mutant of *Yarrowia lipolytica* Lipase 2 in *Pichia pastoris*. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 279–287.

Rajni H. Isolation and Purification of Proteins. Sweden: Lund University. Dekker, 2003. – 581 p.

Rong-Xian Z., Zhong-Wei W., Hai-Yang C. and other. (2022). Production of surfactant-stable keratinase from *Bacillus cereus* YQ15 and its application as detergent additive. *BMC Biotechnology.* 22(26): 1-13.

Wase Master,1. Реактор 200 л AISI 304 лабораторний для виробництва гуматів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://wise-master.com/reaktori/reaktor-200-l-aisi-304-laboratornij-dlya-virobnictva-gumativ>

Wase Master,2. Хімічний реактор, збірник для змішування компонентів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://wise-master.com.ua/ua/p730702549-himicheskij-reaktor-sbornik.html>

Veal D. A., Deere D., Ferrari B., and other. (2020). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods.* 243(2): 191 – 210.

Veerapagu M., Sankara Narayanan A., Ponmurugan K., Jeya K.R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian Journal of pharmaceutical and Clinical Research.* 6(3): 62 – 67.

Vidmar B. & Vodovnik M. (2018). Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications. *Food Technology & Biotechnology.* 56(3): 318 – 328.

Yang Y., Fuxiang W., Rui Z., Fangfang F. and other. (2013). Enhancing the Laccase Production and Laccase Gene Expression in the White-Rot Fungus *Trametes velutina* 5930 with Great Potential for Biotechnological Applications by Different Metal Ions and Aromatic Compounds. *PLOS ONE.* 8(11): 1-9.

Ҁанполи. Упаковка для косметики в роздріб. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://yangoli.com.ua/ua/upakovka_dlya_kosmetiki

Yagmurov E. R., Kozlov G. V., Pushkarev M. A. (2017). Lipase purification: the review of conventional and novel methods. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 1: 60 – 69.

Vijayaraghavan P., Lazarus S., Vincent S. (2014). De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21(1): 27 – 34.

Xueping G., Yanli S., Juzheng S., Fengshan W. (2014). A Novel Hyaluronidase Produced by *Bacillus* sp. A50. *PLOS ONE*. 9 (4): 1 – 8.

Zeng, R., Zhang, R., Zhao, J., Lin, N. (2013) Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization. *Extremophiles*. 7: 335–337.

Автовес. Автовес – ваги та автоматизація обліку. Ваговий дозатор для сипких продуктів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.avtoves.ua/ukr/catalog/vesoizmeritelnyye-sistemy/dozirovaniye/product.html?id=4117>

Білинський Й. Й. & Скалецька М. О. 2023. Аналіз методів та засобів вимірювання сипких продуктів. *Вісник Вінницького політехнічного інституту*. 2(19): 120 – 135.

Борисенко А. В., Антонюк М. М., Айзенберг В.Л., Павліченко Г. К., Капічон Г. П. (2010). Селекція продуцентів позаклітинної ліпази для використання в біотехнології. *Наукові праці НУХТ*. 23: 35 – 37.

Борисенко А. В., Лич І. В., Антонюк М. М. Айзенберг В. Л. (2011) Визначення оптимальних умов культивування *Rhizopus sp* 2000 ФМ – продуцента позаклітинної ліпази. *Харчова промисловість*. 10: 102 – 108.

ВЕНКОН. Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000x500-2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2>

Десятник А. А., Тюрина Ж. П., Клапко С. Ф., Лаблюк С. В. та інші. (2010). Деякі аспекти біосинтеза позаклітинних гідролаз мікроміцетів із родів *Rhizopus* і *Aspargillus* в присутності комплексних з'єднань кобальта (III) з фосфорвмісними аніонами. *Інститут мікробіології і біотехнології*. 3:121 – 128.

Дехтяренко Н. В. & Пескова Л.О. (2014) Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання. Проблеми біології та біотехнології. 3: 63-73.

Интермаш. Автомат фасування в пластикові труби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.intermash.kiev.ua/ukrayins-ka-versiia/obladnannya/fasuvannya-v-tubi/article/avtomat-fasuvannya-v-plastikovii-tubi>

Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. – К: НУХТ, 2019. – 252 с.

Квант успіху. Фільтр грубої очистки повітря для TION O2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kvantum.com.ua/ua/catalog/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-f7-dlya-tion-o2.html>

Компресорне обладнання REMEZA. Стерильні фільтри в нержавіючому корпусі SPF серії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://a-remeza.ru/sterilnyye-filtry-v-nerzh-korpuse-spf-serii>

Методичні вказівки до лабораторної роботи «Поверхневий натяг» з дисципліни «Поверхневі явища та дисперсні системи» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня спеціальностей 161 «Хімічні технології та інженерія» 162 «Біотехнологія та біоінженерія» денної та заочної форм навчання / Укладач к.т.н., доцент В.О. Маховський, м. Кам'янське, ДДТУ, 2018 р. – 10 с.

Некрасов П.О., Плахотна Ю.М., Некрасов О.П. (2011) Дослідження ефективності ферментів щодо гідролітичного розщеплення жирів. Вісник нац. техн. ун-ту ХПІ. 31: 3 – 10.

Промвіт. Технологічна ємність робочим об'ємом 60 л з двома миючими голівками. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/tehnologichna-yemnist-robochim-obyemom-60-l-z-2-miyuchimi-golivkami/>

Роїк О. М. & Нікітіна О. О. (2024). Обґрунтування складу та технології гелю для лікування ран та опіків з шавлії лікарської екстрактом. Технології та інженеринг. 6(11): 89 – 103.

Тертишний О.О., Тертишна О. В. Конспект лекцій з курсу «Процеси та апарати хімічної технології»– Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 79 с.

Ткаченко М. Г. & Перцев І. М. 2002. Обґрунтування промислової технології гелю «Троксирутин 2%». Вісник фармації. 1(29): 50 – 52.

Шеламова С. А. (2012). Науково-практичні аспекти технологій модифікації рослинних олій для жирових продуктів з функціональними властивостями. Автореф. дис. ... докт. техн. наук – 50 с.