

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА
Біологічний факультет
кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Створення та оптимізація процесів ферментації для виробництва
біоактивних речовин**

Допущено до захисту
«__»_____2025 р.

Завідуючий
кафедрою _____

Оцінка «_____»

«__»_____2025 р.

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Васильєвої Вікторії Антонівни

Науковий керівник:
к.б.н., доцент Ковальова М. К.

Харків
2025

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	4
ABSTRACT	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Теоретичні основи ферментації	9
1.1.1 Визначення ферментації та її значення в біотехнології	9
1.1.2 Види ферментації	11
1.1.3 Біологічно активні речовини: визначення, класифікація, значення.....	14
1.2 Біологічно активні речовини та їх застосування.....	17
1.2.1 Огляд біологічно активних речовин (поліфеноли, амінокислоти, вітаміни та ін.).....	17
1.2.2 Виробництво біологічно активних речовин за допомогою ферментації.....	23
1.2.3 Сфери застосування біологічно активних речовин (фармацевтика, харчова промисловість, косметологія).....	31
1.3.1 Основні технології ферментації (потокі, партійна, безперервна).....	36
1.3.2 Умови проведення ферментації (температура, рН, аерація).....	40
1.4 Оптимізація процесів ферментації.....	43
1.4.1 Параметри, що впливають на ефективність ферментації.....	43
1.4.2 Методи оптимізації (статистичні методи, методи експериментального планування).....	48
1.4.3 Приклади успішної оптимізації процесів ферментації.....	53
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	55

2.1	Опис об'єкта дослідження.....	55
2.2.1	Ферментативний гідроліз сироваткових білків	56
2.2.2	Ферментативний синтез біодизельного палива.....	57
2.2.3	Ферментативна обробка ріпакової м'ятки.....	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ		62
3.1	Ферментативний гідроліз сироваткових білків	62
3.2	Ферментативний синтез біодизельного палива.....	67
3.3	Ферментативна обробка ріпакової м'ятки.....	69
3.4	Узагальнення результатів проведених досліджень.....	73
ВИСНОВКИ.....		75
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		76

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена теоретичному аналізу та практичній реалізації процесів ферментації з метою одержання біологічно активних речовин (БАР). Розглянуто основні види ферментації, їх механізми та вплив на синтез поліфенолів, пептидів, органічних кислот, вітамінів та інших БАР.

У роботі акцентовано увагу на перевагах ферментаційного підходу до виробництва БАР у порівнянні з хімічним синтезом, включаючи екологічну безпеку, підвищену біодоступність і економічну ефективність.

Проведено серію експериментів з ферментативної обробки різних субстратів (молочної сироватки, ріпакової м'ятки, тригліцеридів) з метою оптимізації умов процесу.

Результати дослідження демонструють перспективність використання ферментації для створення високоефективних біоактивних компонентів, що можуть знайти застосування в харчовій, фармацевтичній, косметичній та сільськогосподарській галузях.

Ключові слова: ферментація; біоактивні речовини; пептиди; молочна сироватка; оптимізація процесу; ріпакова м'ятка; біодизель

Робота включає: 84 сторінки, 15 рисунків, 9 таблиць, 57 джерел

ABSTRACT

The qualification work is dedicated to the theoretical analysis and practical implementation of fermentation processes aimed at obtaining bioactive substances (BAS). It examines the main types of fermentation, their mechanisms, and their impact on the synthesis of polyphenols, peptides, organic acids, vitamins, and other BAS.

The work emphasizes the advantages of the fermentation approach to BAS production compared to chemical synthesis, including environmental safety, increased bioavailability, and economic efficiency.

A series of experiments on the enzymatic treatment of various substrates (whey, rapeseed meal, triglycerides) were conducted to optimize the process conditions.

The results of the study demonstrate the potential of using fermentation to create highly effective bioactive components that can find applications in the food, pharmaceutical, cosmetic, and agricultural industries.

Keywords: *fermentation; bioactive substances; peptides; whey; process optimization; rapeseed meal; biodiesel.*

The work includes: 84 pages, 15 figures, 9 tables, 57 references.

ВСТУП

Ферментація - один із найдавніших біотехнологічних процесів, що тисячоліттями використовується людством для отримання продуктів харчування, напоїв та інших корисних речовин. У сучасному контексті біотехнологічного виробництва, ферментаційні процеси набувають нового значення як ефективний метод отримання біологічно активних сполук із цінними властивостями для різних галузей промисловості - від харчової до фармацевтичної та косметичної. Значна увага наукової спільноти приділяється розробці та оптимізації ферментаційних процесів, що здатні забезпечити високий вихід цільових біоактивних речовин при мінімальних енергетичних та матеріальних витратах.

Актуальність дослідження ферментаційних процесів для виробництва біоактивних речовин зумовлена кількома ключовими факторами. Сучасна наука визнає існування різних типів ферментації, проте в загальному визначенні ферментація - це біохімічний процес, за допомогою якого більшість мікроорганізмів розкладають вуглеводи для виробництва енергії в анаеробних умовах. Цей природний процес можна використовувати для отримання численних біоактивних сполук із високою доданою вартістю.

Біологічно активні сполуки, отримані в результаті ферментації, мають потенціал для лікування різних захворювань, включаючи харчову непереносимість, шлунково-кишкові ускладнення, цукровий діабет, запальні захворювання кишечника, захворювання печінки та навіть рак. Ці речовини можуть слугувати важливим функціональним інгредієнтом харчових продуктів і мати широке застосування у харчовій та фармацевтичній промисловості.

Виробництво біоактивних сполук має виняткове значення для косметичної промисловості, де вони використовуються для створення косметичних продуктів із фармацевтичним терапевтичним ефектом, так званих «космецевтиків». Такі активні інгредієнти можуть бути виділені та очищені з природних джерел, але також можуть бути отримані

біотехнологічно шляхом ферментації та клітинних культур або шляхом ферментативного синтезу та модифікації природних сполук.

Оптимізація ферментаційних процесів представляє особливий науковий та практичний інтерес, оскільки вимагає контролю різних параметрів, таких як температура, рН середовища, аерація, склад поживного середовища та тривалість ферментації. Використання сучасних підходів до оптимізації, включаючи статистичні методи та методи експериментального планування, дозволяє значно підвищити ефективність ферментаційних процесів.

Розроблення та впровадження нових технологій ферментації для виробництва біоактивних речовин сприятиме розвитку біоекономіки та створенню продуктів з високою доданою вартістю на основі відновлюваної сировини. Перспективним напрямком є використання побічних продуктів харчової промисловості, таких як молочна сироватка, для отримання біологічно активних пептидів та інших цінних сполук.

Мета дослідження полягає у розробці та оптимізації процесів ферментації для ефективного виробництва біологічно активних речовин із заданими властивостями.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання**:

1. Проаналізувати сучасний стан наукових досліджень в галузі ферментаційних процесів та виробництва біоактивних речовин.
2. Дослідити основні види ферментації та їх потенціал для отримання різних класів біоактивних сполук.
3. Визначити ключові параметри, що впливають на ефективність ферментаційних процесів та якість отримуваних біоактивних речовин.
4. Проаналізувати досвід інших дослідників щодо оптимізації ферментативних процесів.

Об'єкт дослідження - процеси ферментації для виробництва біологічно активних речовин.

Предмет дослідження - закономірності впливу технологічних параметрів на ефективність ферментаційних процесів та якісні характеристики отримуваних біоактивних речовин.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Теоретичні основи ферментації

1.1.1 Визначення ферментації та її значення в біотехнології

Ферментація є одним із найдавніших і найважливіших біотехнологічних процесів, що продовжує відігравати ключову роль у сучасних біотехнологіях як метод перетворення сировини на цінні продукти. Цей процес характеризується використанням мікроорганізмів або їхніх ферментних систем для трансформації органічних субстратів. З біохімічної точки зору, ферментація представляє собою тип анаеробного метаболізму, під час якого органічні молекули, такі як глюкоза чи інші сахари, катаболізуються та відновлюються шляхом передачі електронів іншим органічним молекулам (кофакторам, коферментам тощо) [1].

Історично, ферментаційні процеси використовуються людством понад 13 000 років для виробництва та консервування харчових продуктів. Ці процеси пов'язуються з користю для здоров'я, унікальними смаковими профілями та покращенням текстури продуктів. Сучасне наукове розуміння механізмів ферментації дозволило розширити спектр її використання, створюючи контрольовані умови для цілеспрямованого отримання бажаних біологічно активних сполук [2].

У працях Міжнародної наукової асоціації з пробіотиків і пребіотиків (ISAPP) зазначається, що ферментовані харчові продукти визначаються як «продукти, виготовлені через дію живих мікроорганізмів, де ферментація викликає бажані зміни в харчових продуктах» [3]. Варто зауважити, що за власною природою ферментаційні процеси сприяють поліпшенню збереженості, поживної цінності та біодоступності різних речовин.

Сучасну ферментацію можна проводити двома основними способами:

1. спонтанна ферментація - процес здійснюється автохтонною (місцевою/аборигенною) мікрофлорою сировини або виробничого середовища, наприклад, квашена капуста, кімчі та деякі ферментовані соєві продукти;

2. контрольована ферментація зі стартовими культурами - для досягнення ферментації необхідно додавання стартових культур, наприклад, кефір, йогурт, комбуча та натто [1].

Сучасні біотехнологічні досягнення дозволили розширити спектр використання ферментації за межі традиційного виробництва харчових продуктів. У фармацевтичній промисловості ферментація використовується для виробництва антибіотиків, вакцин та інших лікарських засобів. У харчовій промисловості - для поліпшення харчової цінності продуктів, створення функціональних харчових інгредієнтів та підвищення засвоюваності поживних речовин [4].

Значний потенціал має використання ферментації для виробництва біоактивних сполук, які можуть використовуватися у косметичній промисловості. Ці речовини можуть бути вилучені та очищені з природних джерел, але також можуть бути отримані біотехнологічно шляхом ферментації та клітинних культур або шляхом ферментативного синтезу та модифікації природних сполук [4].

Таким чином, ферментація є ключовим інструментом біотехнології, що забезпечує стійке виробництво цінних продуктів із природної сировини, включаючи біологічно активні речовини з широким спектром застосування.

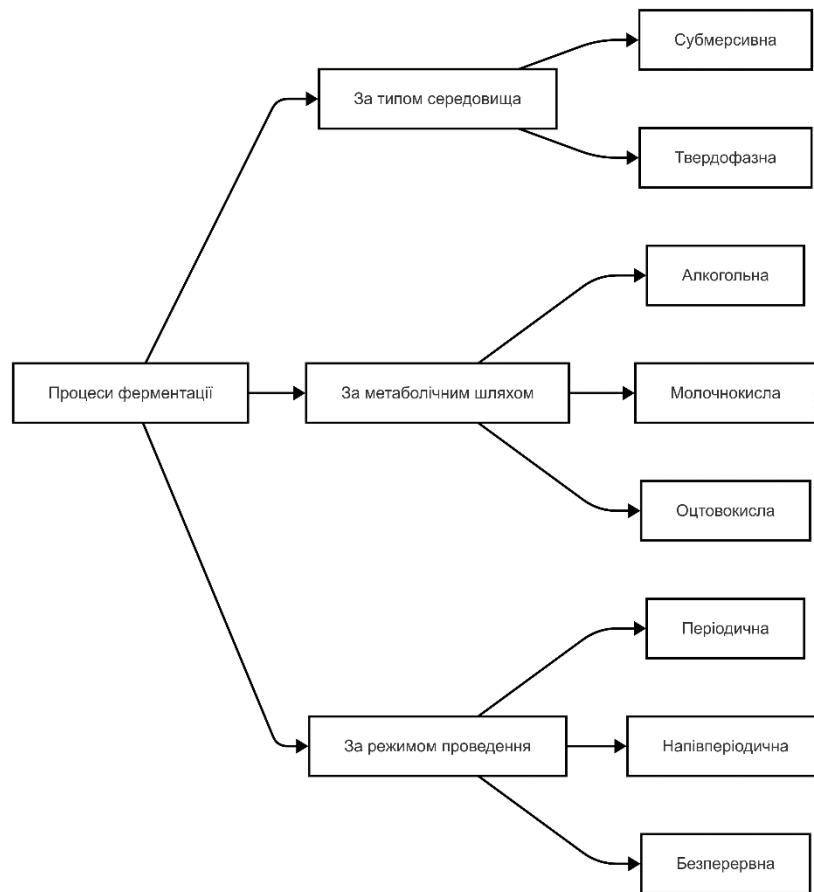


Рис. 1.1 Класифікація процесів ферментації за різними критеріями

Примітка: створено на основі джерел [1-3]

Наведена схема (рис. 1.1) демонструє різноманіття ферментаційних процесів, які класифікуються за декількома ключовими критеріями: типом середовища, метаболічними шляхами та режимом проведення. Ця багатогранна класифікація підкреслює універсальність ферментації як біотехнологічного методу, що може бути адаптований під різні виробничі потреби.

1.1.2 Види ферментації

Ферментаційні процеси класифікуються за різними критеріями, включаючи тип середовища, метаболічні шляхи та режим проведення. Кожен тип ферментації має свої особливості, переваги та галузі застосування.

Розуміння специфіки різних видів ферментації дозволяє обрати оптимальний процес для отримання конкретних біоактивних речовин [9].

За типом середовища ферментації розрізняють субмерсивну (занурену) та твердофазну ферментацію. Субмерсивна ферментація (Submerged fermentation, SmF) – це процес, в якому мікроорганізми ростуть у рідкому середовищі. Переваги цього методу включають високий ступінь контролю параметрів, масштабованість та можливість безперервного виробництва. Однак, субмерсивна ферментація має і недоліки, такі як високі енергозатрати та потреба в складному обладнанні [9].

Твердофазна ферментація (Solid-state fermentation, SSF) – це процес, в якому мікроорганізми ростуть на твердому субстраті з низьким вмістом вологи. Цей метод має переваги у вигляді низьких енергозатрат, високого виходу деяких біоактивних речовин та можливості використання агропромислових відходів. Проте, твердофазна ферментація стикається з проблемами контролю параметрів та масштабування. Сучасні дослідження зосереджені на розробці ефективних біореакторів для твердофазної ферментації, які дозволяють подолати ці обмеження [10].

Таблиця 1.3 узагальнює основні характеристики різних типів ферментації за метаболічним шляхом [11-13].

Таблиця 1.3

Порівняння основних типів ферментації за метаболічним шляхом

Тип ферментації	Основні продукти	Мікроорганізми	Застосування	Специфічні особливості
Алкогольна	Етанол, CO ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	Виробництво алкогольних напоїв, біопалива	Анаеробний процес, високий вихід етанолу
Молочнокисла гомоферментативна	Молочна кислота	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Виробництво йогуртів, сирів, квашених овочів	Утворюється переважно молочна кислота
Молочнокисла гетероферментативна	Молочна кислота, етанол, оцтова кислота, CO ₂	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>	Ферментовані харчові продукти, силосування	Утворюється суміш продуктів

Варто зазначити, що в сучасній біотехнології існує тенденція до використання змішаних культур мікроорганізмів та комбінованих ферментаційних процесів для отримання складних біоактивних речовин. Такий підхід дозволяє використовувати синергетичний ефект різних мікроорганізмів та підвищувати ефективність виробництва [14].

Наприклад, ко-культивування молочнокислих бактерій та дріжджів у виробництві кефіру забезпечує унікальні органолептичні властивості та високий вміст біоактивних компонентів. Аналогічно, при виробництві комбучі використовується симбіотична культура дріжджів та бактерій, що дозволяє отримувати напій з високим вмістом органічних кислот, вітамінів та інших біоактивних речовин [14].

У сучасній біотехнології активно розвивається напрямок інженерії метаболічних шляхів мікроорганізмів для оптимізації ферментаційних процесів. Це дозволяє розробляти штами з підвищеною продуктивністю щодо цільових біоактивних речовин та зниженням утворенням побічних продуктів. Наприклад, шляхом модифікації метаболічних шляхів *Saccharomyces cerevisiae* вдається підвищити вихід етанолу та знизити утворення гліцерину під час спиртової ферментації [14].

Представлена схема (рис. 1.3) ілюструє основні біохімічні шляхи різних типів ферментації. Видно, що всі ці шляхи відгалужуються від гліколізу, але відрізняються кінцевими продуктами та метаболічними проміжними сполуками. Розуміння цих шляхів є ключовим для розробки стратегій оптимізації ферментаційних процесів. [11-14]

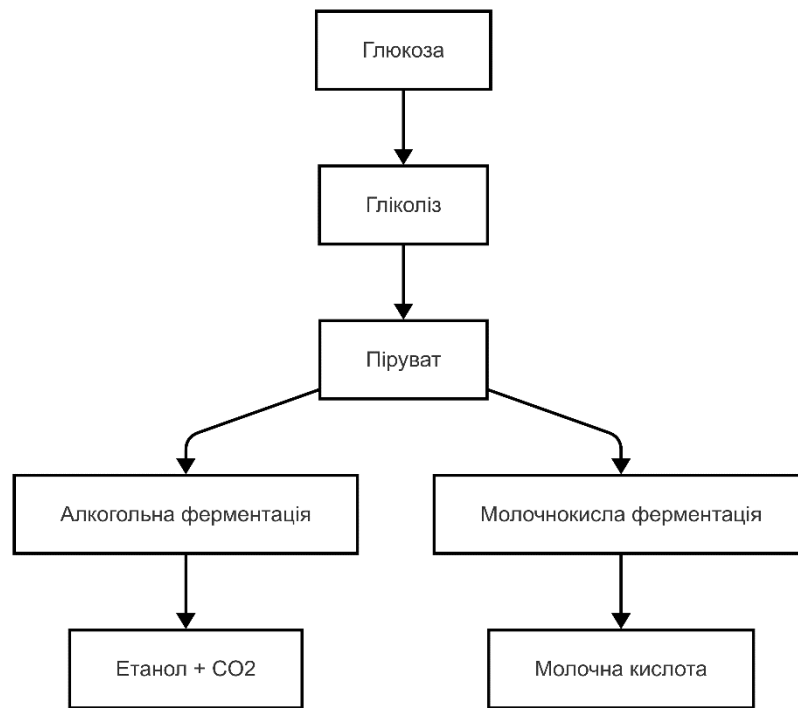


Рис. 1.3 Біохімічні шляхи основних типів ферментації

Правильний вибір типу ферментації відповідно до бажаних біоактивних речовин, доступних субстратів та економічних факторів є ключовим для успішного біотехнологічного виробництва. Комбінування різних підходів до ферментації та інноваційні методи контролю процесу дозволяють максимізувати ефективність виробництва та якість отримуваних біоактивних речовин.

1.1.3 Біологічно активні речовини: визначення, класифікація, значення

Біологічно активні речовини (БАР) – це сполуки природного або синтетичного походження, здатні регулювати та модифікувати біологічні процеси в живих організмах. Особливе значення мають БАР, отримані шляхом ферментації, оскільки вони часто демонструють підвищену біологічну активність та біодоступність порівняно з їхніми синтетичними аналогами [15].

З біохімічної точки зору, БАР представляють собою молекули різних класів, які взаємодіють з біологічними системами організму (ферментами,

рецепторами, нуклеїновими кислотами) та модулюють їхню активність. Завдяки цій властивості, БАР здатні впливати на метаболічні процеси, імунну відповідь, експресію генів та інші фундаментальні біологічні процеси [15].

Біологічно активні речовини, отримані в результаті ферментації, мають потенціал для лікування різних захворювань, включаючи харчову непереносимість, шлунково-кишкові ускладнення, цукровий діабет, запальні захворювання кишечника, захворювання печінки та навіть рак. Ці сполуки можуть слугувати важливою функціональною їжею та мати широке застосування у харчовій та фармацевтичній промисловості [16].

Біологічно активні речовини класифікуються за хімічною структурою та функціональними властивостями, включаючи вторинні метаболіти, ферменти, органічні кислоти, полісахариди, біоактивні пептиди та поліфенольні сполуки.

Поліфенольні сполуки представляють собою велику групу сполук, що характеризуються наявністю численних фенольних груп. Ферментація суттєво збільшує вміст та біодоступність поліфенолів у продуктах завдяки мікробному руйнуванню клітинних стінок рослинної сировини. Основні підгрупи поліфенолів, що утворюються під час ферментації, включають флавоноїди (кверцетин, катехіни, антоціани), фенольні кислоти (галова, кавова, ферулова), стильбени (ресвератрол) та лігнани [17].

Дослідження ферментації ягідного жмиху показало, що процес ферментації з використанням молочнокислих бактерій та дріжджів значно збільшував загальний вміст поліфенолів та антиоксидантну активність. Наприклад, у ферментованому жмиху чорноплідної горобини, інокульованому дріжджами, вміст поліфенолів досягав 158,21 мг GA/л [18].

Біологічно активні речовини, отримані шляхом ферментації, мають широкий спектр застосування в різних галузях. У фармацевтичній промисловості вони використовуються для розробки антибіотиків, імуномодуляторів, ферментних препаратів та інших лікарських засобів. Прикладом можуть слугувати біоактивні пептиди, отримані з ферментованих

молочних продуктів, які проявляють антигіпертензивну, антиоксидантну та імуномодулюючу активність [19].

У харчовій промисловості БАР використовуються як функціональні інгредієнти, натуральні консерванти, ароматизатори та покращувачі текстури. Ферментовані харчові продукти, такі як йогурт, кефір, комбуча, містять численні біоактивні компоненти, що забезпечують їх функціональні властивості [19].

Косметична промисловість активно використовує БАР, отримані шляхом ферментації, для розробки «космецевтиків» – косметичних продуктів з терапевтичними властивостями. Поліфенольні сполуки, ферменти, біоактивні пептиди та органічні кислоти є цінними компонентами косметичних засобів, що забезпечують антивікові, зволожуючі, відбілюючі та захисні властивості [19].

Представлена схема (рис. 1.4) ілюструє різноманітні сфери застосування біологічно активних речовин, отриманих шляхом ферментації. Широкий спектр застосування цих сполук підкреслює їх значущість для сучасної біотехнології та суміжних галузей. [16-19]

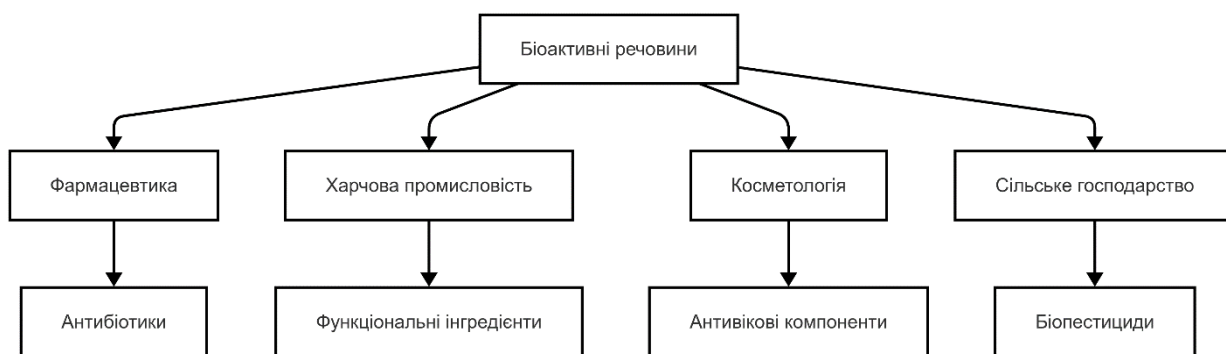


Рис. 1.4 Застосування біологічно активних речовин, отриманих шляхом ферментації

Сучасні дослідження в галузі біологічно активних речовин зосереджені на розробці нових методів їх отримання, вивченні механізмів дії та розширенні спектру застосування. Особливу увагу приділяють ферментативним

модифікаціям БАР для покращення їх функціональних властивостей. Наприклад, ферментативна модифікація поліфенолів може підвищувати їх антиоксидантну активність та біодоступність [19].

Таким чином, біологічно активні речовини, отримані шляхом ферментації, представляють собою цінний ресурс для різних галузей промисловості, включаючи фармацевтику, харчову промисловість та косметологію. Розуміння їх хімічної структури, механізмів дії та методів отримання є ключовим для розробки ефективних стратегій їх виробництва та застосування.

1.2 Біологічно активні речовини та їх застосування

1.2.1 Огляд біологічно активних речовин (поліфеноли, амінокислоти, вітаміни та ін.)

Біологічно активні речовини (БАР) становлять великий інтерес для сучасної біотехнології завдяки своїм унікальним властивостям і широкому спектру застосування. Ферментаційні процеси дозволяють отримувати різноманітні БАР із природної сировини, при цьому збільшуючи їх біодоступність та функціональні характеристики. Детальний огляд основних класів таких сполук дозволяє краще зрозуміти їх потенціал та механізми дії [20].

Поліфенольні сполуки представляють собою клас БАР, що характеризуються наявністю багатьох фенольних груп у своїй структурі. До цієї категорії належать флавоноїди, фенольні кислоти, таніни, стильбени та лігнани. Ферментація суттєво підвищує вміст та біодоступність поліфенолів у харчових продуктах завдяки розкладанню клітинних стінок рослинної сировини мікроорганізмами та вивільненню зв'язаних форм поліфенолів [21].

Флавоноїди, що включають катехіни, кверцетин, рутин та антоціани, проявляють потужні антиоксидантні властивості, захищаючи клітини від окисного стресу та пошкоджень вільними радикалами. Під час ферментації

відбувається деглікозилювання флавоноїдних глікозидів, що призводить до утворення агліконів з підвищеною біологічною активністю. Наприклад, ферментація зеленого чаю за допомогою грибів роду *Aspergillus* підвищує вміст катехинів та їх антиоксидантну активність на 50-70% [21].

Фенольні кислоти, такі як галова, кавова, ферулова та п-кумарова, також мають потужні антиоксидантні властивості та протизапальну активність. Ці сполуки часто зустрічаються у зв'язаній формі в клітинних стінках рослин, але під час ферментації вивільняються завдяки дії мікробних ферментів, таких як ферулоїл естерази та таннази [22].

Важливими представниками поліфенолів є також гідроксикоричні кислоти (ГКК), які включають ферулову, кавову, п-кумарову та сіапову кислоти. Вони мають широкий спектр біологічної активності, включаючи антиоксидантні, протизапальні, протимікробні, протипухлинні та анти-ВІЛ ефекти. ГКК часто зустрічаються в рослинах як компоненти арабіноксиланів у клітинних стінках, де вони забезпечують зв'язок з лігніном [22].

Амінокислоти та біоактивні пептиди формують іншу важливу групу БАР, що можуть бути отримані шляхом ферментації. Молочнокислі бактерії (МКБ) відомі своєю здатністю продукувати значну кількість біоактивних сполук під час ферментації. Молочнокислі бактерії продукують широкий спектр біоактивних сполук, включаючи пептиди, екзополісахариди, бактеріоцини та органічні кислоти.

Ферментативний гідроліз білків молока, сої, м'яса та інших субстратів призводить до утворення пептидів з різними біологічними властивостями, включаючи антиоксидантні, імуномодулюючі та протизапальні. Ці пептиди зазвичай складаються з 2-20 амінокислотних залишків і мають специфічні послідовності, що визначають їх біологічну активність [24].

Наприклад, при ферментації молочної сироватки утворюються біоактивні пептиди з антигіпертензивними, імуномодулюючими, антиоксидантними та мінералозв'язуючими властивостями. Дослідження показують, що гідролізати сироваткових білків, отримані за допомогою

ферменту Alcalase, мають підвищену антиоксидантну активність порівняно з нативними білками [24].

На рис. 2.1 представлено основні класи біоактивних речовин, що утворюються під час ферментації, та їх біологічні властивості. [20-24]

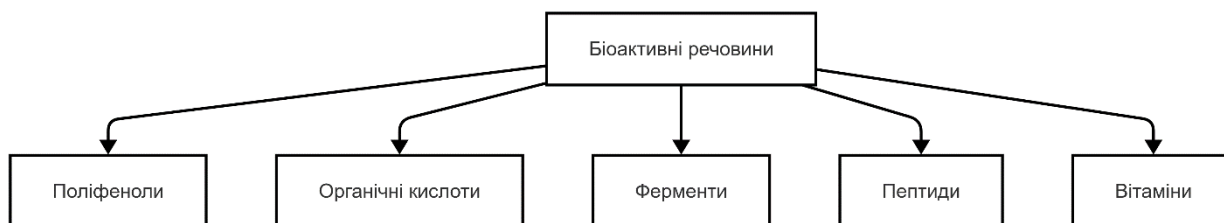


Рис. 2.1 Основні класи біоактивних речовин та їх біологічні властивост

Вітаміни та мікроелементи також можуть бути продуковані або збагачені під час ферментації. Мікроорганізми здатні синтезувати багато вітамінів в процесі ферментації:

1. вітаміни групи В (В1, В2, В6, В12);
2. вітамін К2 (менахінон);
3. вітамін С (в деяких ферментованих продуктах).

Дослідження показують, що у ферментованому жмиху чорноплідної горобини вміст вітаміну С може досягати 1,19 мг/100 г при використанні бактеріальної ферментації [25].

Крім того, ферментація може підвищувати біодоступність мінералів, таких як залізо, цинк і кальцій, завдяки розкладанню фітатів та інших антинутрієнтів, що зв'язують мінерали. Це особливо важливо для рослинних продуктів, які містять значну кількість фітатів [25].

Органічні кислоти є ще одним класом БАР, що утворюються під час ферментації. Вони відіграють важливу роль у консервуванні ферментованих продуктів, а також мають власні біологічні властивості:

1. молочна кислота (антимікробні властивості, модуляція кишкового мікробіому);
2. оцтова кислота (антимікробна дія);

3. пропіонова кислота (пригнічення росту плісняви);
4. цитрат (антиоксидант, хелатор металів);
5. бурштинова кислота (метаболический модулятор) [26].

Молочна кислота є важливою біологічною сполукою, яка сприяє покращенню текстури, смаку та харчової цінності, а також знижує значення рН середовища, що пригнічує розвиток шкідливих мікроорганізмів. Під час ферментації молочнокислими бактеріями, така як *Lactobacillus* та *Streptococcus*, молочна кислота є основним продуктом метаболізму вуглеводів [26].

Бактеріоцини та антимікробні сполуки продукуються багатьма мікроорганізмами, що використовуються у ферментації:

1. нізін (*Lactococcus lactis*);
2. реутерин (*Lactobacillus reuteri*);
3. плантарицин (*Lactobacillus plantarum*) [27].

Ці сполуки забезпечують не лише безпеку ферментованих продуктів, але й можуть використовуватися як натуральні консерванти та компоненти терапевтичних препаратів. Бактеріоцини мають вузький спектр дії та зазвичай активні проти споріднених бактерій, що робить їх цінними альтернативами традиційним антибіотикам [27].

В таблиці 2.1 представлені основні класи біоактивних речовин, що отримуються шляхом ферментації, та їх ключові властивості. [20-27]

Таблиця 2.1

Основні класи біоактивних речовин, що отримуються шляхом ферментації, та їх ключові властивості

Клас біоактивних речовин	Приклади	Механізм дії	Біологічні властивості	Застосування
Поліфеноли	Катехіни, кверцетин, рутин, ферулова кислота	Антиоксидантні а дія, зв'язування вільних радикалів,	Антиоксидантні, протизапальні, кардіопротекторні, протипухлинні	Функціональні харчові продукти, нутрицевтики, космецевтики

		хелатування металів		
Біоактивні пептиди	АСЕ-інгібуючі пептиди, імуномодулюючі пептиди, антиоксидантні пептиди	Взаємодія з рецепторами, модуляція ферментативної активності	Антигіпертензивні, імуномодулюючі, антиоксидантні, мінералозв'язуючі	Функціональні харчові інгредієнти, фармацевтичні препарати
Органічні кислоти	Молочна, оцтова, пропіонова, бурштинова кислоти	Зниження рН, пригнічення росту патогенів, метаболічна модуляція	Антимікробні, консервуючі, пребіотичні, метаболічні ефекти	Харчові консерванти, функціональні харчові інгредієнти
Бактеріоцини	Нізін, реутерин, плантарицин	Формування пор у клітинних мембранах, інгібування синтезу клітинної стінки	Антимікробні, селективна токсичність	Натуральні консерванти, харчові інгредієнти, терапевтичні агенти

Екзополісахариди (ЕПС) є ще одним важливим класом БАР, що продукуються мікроорганізмами під час ферментації. ЕПС – це високомолекулярні вуглеводні полімери, що секретуються мікроорганізмами у зовнішнє середовище. Вони мають різноманітні функції, включаючи захист від несприятливих умов, адгезію до поверхонь та формування біоплівки [28].

ЕПС, продуковані молочнокислими бактеріями, такими як *Lactobacillus*, *Streptococcus* та *Leuconostoc*, мають потенційні пребіотичні, імуномодулюючі та холестеролзнижуючі властивості. Крім того, ЕПС можуть покращувати текстуру та реологічні властивості ферментованих продуктів [28].

Ферменти, що продукуються мікроорганізмами під час ферментації, також можуть розглядатися як біоактивні речовини з широким спектром застосування. Вони включають:

1. амілази (розщеплення крохмалю);
2. протеази (розщеплення білків);
3. ліпази (розщеплення ліпідів);
4. целюлази (розщеплення целюлози);

5. пектинази (розщеплення пектину) [29].

Ці ферменти не лише беруть участь у ферментаційних процесах, але й можуть бути виділені та використані в різних галузях промисловості. Крім того, деякі ферменти, такі як лактаза (β -галактозидаза), можуть поліпшувати засвоюваність ферментованих продуктів, розщеплюючи лактозу до глюкози та галактози, що особливо важливо для людей з лактазною недостатністю [29].

Оцінка біологічної активності різних сполук, отриманих шляхом ферментації, здійснюється за допомогою різноманітних методів:

1. антиоксидантна активність – DPPH, ABTS, FRAP, ORAC аналізи;
2. антимікробна активність – дифузійні методи, визначення мінімальної інгібуючої концентрації;
3. ферментативна активність – специфічні субстратні аналізи;
4. імуномодуюча активність – клітинні культури, аналізи цитокінів;
5. антигіпертензивна активність – інгібування ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ) [30].

Формула для розрахунку антиоксидантної активності методом DPPH може бути представлена як:

$$\text{Антиоксидантна активність(\%)} = \frac{A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}}{A_{\text{контроль}}} \times 100, \quad (3)$$

де:

1. $A_{\text{контроль}}$ - оптична густина контрольного розчину;
2. $A_{\text{зразок}}$ - оптична густина дослідного зразка.

Комплексний підхід до вивчення біоактивних речовин, отриманих шляхом ферментації, вимагає застосування сучасних аналітичних методів, таких як високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), мас-спектрометрія, ядерний магнітний резонанс (ЯМР) та інфрачервона спектроскопія з Фур'є-перетворенням (FTIR). Ці методи дозволяють ідентифікувати та кількісно визначати біоактивні сполуки у складних матрицях [30].

Сучасні дослідження в галузі біоактивних речовин зосереджені на розробці нових методів їх отримання, вивченні механізмів дії та розширенні спектру застосування. Особливу увагу приділяють ферментативним модифікаціям БАР для покращення їх функціональних властивостей. Наприклад, ферментативна модифікація поліфенолів може підвищувати їх антиоксидантну активність та біодоступність [30].

Таким чином, біоактивні речовини, отримані шляхом ферментації, представляють собою різноманітний клас сполук з широким спектром біологічних властивостей та потенційних застосувань. Розуміння їх структури, механізмів дії та методів отримання є ключовим для розробки ефективних стратегій їх виробництва та застосування в різних галузях, від харчової промисловості до фармацевтики та косметології.

1.2.2 Виробництво біологічно активних речовин за допомогою ферментації

Виробництво біологічно активних речовин шляхом ферментації має низку переваг порівняно з іншими методами, такими як хімічний синтез або екстракція з природних джерел. Ці переваги включають екологічну стійкість, специфічність, підвищену біодоступність, економічну ефективність та можливість отримання нових сполук [31].

Технологія виробництва БАР шляхом ферментації базується на здатності мікроорганізмів перетворювати прості субстрати на складні біологічно активні молекули. Цей процес може бути оптимізований шляхом вибору відповідних мікроорганізмів, субстратів та умов ферментації для максимізації виходу цільових продуктів [31].

Вибір мікроорганізмів для ферментації є ключовим фактором у виробництві БАР. Залежно від цільових продуктів, можуть використовуватися різні групи мікроорганізмів:

1. бактерії (*Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*);
2. гриби (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*);

3. актиноміцети [32].

Кожна група мікроорганізмів має свої особливості та переваги. Наприклад, молочнокислі бактерії (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) широко використовуються для виробництва ферментованих молочних продуктів, збагачених біоактивними пептидами та органічними кислотами. Гриби роду *Aspergillus* та *Penicillium* використовуються для виробництва ферментів та вторинних метаболітів з антибіотичними властивостями. Дріжджі *Saccharomyces* використовуються для виробництва алкогольних напоїв, біоетанолу та біоактивних компонентів [32].

Сучасні дослідження в галузі біотехнології зосереджені на розробці високопродуктивних штамів мікроорганізмів шляхом генетичної інженерії та селекції. Наприклад, шляхом модифікації метаболічних шляхів *Saccharomyces cerevisiae* вдається підвищити вихід етанолу та знизити утворення гліцерину під час спиртової ферментації [32].

Субстрати для ферментації можуть бути різноманітними:

1. чисті вуглеводи (глюкоза, сахароза, лактоза);
2. білкові гідролізати (пептон, соєві гідролізати);
3. рослинні рештки (жмих, висівки, пульпа);
4. молочна сироватка та інші промислові побічні продукти;
5. спеціально розроблені синтетичні середовища [33].

Особливу увагу приділяють використанню відходів агропромислового виробництва як субстратів для ферментації. Ці відходи часто багаті на вуглеводи, білки та інші поживні речовини, необхідні для росту мікроорганізмів та синтезу цільових продуктів. Наприклад, молочна сироватка, побічний продукт при виробництві сиру, містить лактозу, сироваткові білки та мінерали, що робить її цінним субстратом для виробництва біоактивних пептидів, органічних кислот та пробіотичних культур [33].

Рослинні відходи, такі як фруктовий та овочевий жмих, багаті на клітковину, пектин, поліфеноли та інші сполуки, що можуть бути перетворені

на цінні біоактивні речовини шляхом ферментації. Наприклад, ферментація ягідного жмиху молочнокислими бактеріями та дріжджами призводить до збільшення вмісту поліфенолів та антиоксидантної активності [33].

Типи ферментаційних процесів для виробництва БАР включають:

1. мікробну трансформацію - перетворення субстрату на цільові біоактивні сполуки;
2. ко-культивування - використання симбіотичних культур мікроорганізмів;
3. твердофазну ферментацію агропромислових відходів - економічно ефективний підхід для отримання поліфенолів та інших біоактивних речовин;
4. високощільнісне культивування - для максимізації виходу продукту на одиницю об'єму [34].

Особливий інтерес представляє виробництво біоактивних фенольних сполук шляхом твердофазної ферментації (SSF), яка дозволяє використовувати агропромислові відходи як субстрати. Наприклад, дослідження показують, що SSF грибами роду *Rhizopus* на побічних продуктах переробки фруктів підвищувала вміст антоціанів та загальну антиоксидантну активність [34].

На рис. 2.2 представлена схема основних етапів виробництва біоактивних речовин шляхом ферментації. [31-35]

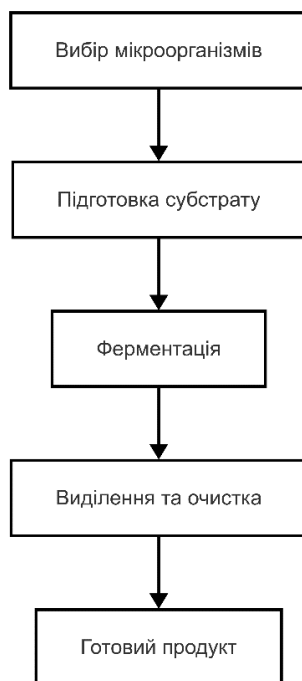


Рис. 2.2 Схеми виробництва біоактивних речовин шляхом ферментації

Основні етапи виробництва БАР шляхом ферментації включають:

1. підготовку субстрату (подрібнення, стерилізація, коригування рН та поживних компонентів);
2. підготовку інокуляту (вибір та активація відповідних мікроорганізмів);
3. ферментацію (в контрольованих умовах температури, рН, аерації);
4. моніторинг процесу та контроль параметрів;
5. постферментаційну обробку (відділення біомаси, виділення та очищення цільових продуктів) [35].

Ферментація молочної сироватки є перспективним напрямком виробництва БАР. Сироваткові білки (β -лактоглобулін, α -лактальбумін, імуноглобуліни, альбумін сироватки крові) можуть бути гідролізовані ферментами або мікроорганізмами з утворенням біоактивних пептидів з різними функціональними властивостями [36].

Дослідження показують, що гідролізати сироваткових білків, отримані за допомогою ферменту Alcalase, мають підвищену антиоксидантну

активність порівняно з нативними білками. Ступінь гідролізу (DH) білків сироватки впливає на біологічні властивості отриманих пептидів. При DH 15-20% утворюються пептиди з оптимальними антиоксидантними та імуномодулюючими властивостями [36].

Формула для розрахунку ступеня гідролізу (DH) може бути представлена як:

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100, \quad (4)$$

де:

1. h - кількість пептидних зв'язків, розщеплених під час гідролізу;
2. h_{tot} - загальна кількість пептидних зв'язків у білку.

Для моніторингу ступеня гідролізу використовуються різні методи, такі як рН-стат, ОРА (о-фталальдегідний) метод та модифікований спектрофотометричний метод. Наприклад, метод рН-стат базується на титруванні амінних груп, що вивільняються під час гідролізу [37].

Виробництво поліфенольних сполук шляхом ферментації є ще одним перспективним напрямком. Ферментація рослинної сировини, багатої на поліфеноли, такої як фрукти, ягоди, чай, какао, може підвищувати вміст та біодоступність поліфенолів [38].

Наприклад, ферментація зеленого чаю грибами роду *Aspergillus* підвищує вміст катехінів та їх антиоксидантну активність. Під час ферментації відбувається деглікозилювання флавоноїдних глікозидів, що призводить до утворення агліконів з підвищеною біологічною активністю [38].

Ферментація ягідного жмиху молочнокислими бактеріями та дріжджами призводить до збільшення вмісту поліфенолів та антиоксидантної активності. Наприклад, у ферментованому жмиху чорноплідної горобини, інокульованому дріжджами, вміст поліфенолів досягав 158,21 мг ГА/л [38].

Виробництво органічних кислот шляхом ферментації є важливим напрямком біотехнології. Молочна, оцтова, пропіонова, лимонна та бурштинова кислоти є цінними БАП з широким спектром застосування [39].

Молочнокисла ферментація є основним методом виробництва молочної кислоти. *Lactobacillus*, *Streptococcus* та інші молочнокислі бактерії перетворюють вуглеводи (глюкозу, лактозу) на молочну кислоту. Залежно від штаму мікроорганізмів, ферментація може бути гомоферментативною (основний продукт - молочна кислота) або гетероферментативною (утворюються молочна кислота, етанол, оцтова кислота та CO₂) [39].

Промислове виробництво лимонної кислоти здійснюється шляхом ферментації грибом *Aspergillus niger*. Цей процес вимагає оптимізації багатьох параметрів, включаючи склад середовища, температуру, рН, аерацію. Лимонна кислота широко використовується в харчовій промисловості як підкислювач та консервант, а також має антиоксидантні властивості [39].

Таблиця 2.2 узагальнює основні типи ферментаційних процесів для виробництва різних БАР. [31-39]

Таблиця 2.2

Основні типи ферментаційних процесів для виробництва біоактивних речовин

Тип ферментації	Мікроорганізми	Субстрати	Цільові БАР	Переваги	Обмеження
Субмерсивна ферментація	Бактерії, гриби, дріжджі	Рідкі середовища, розчинні субстрати	Ферменти, органічні кислоти, антибіотики	Висока продуктивність, легкість масштабування, добрий контроль параметрів	Високі енергозатрати, складне обладнання
Твердофазна ферментація	Гриби, актиноміцети	Агропромислові відходи, нерозчинні субстрати	Поліфеноли, ферменти, вторинні метаболіти	Низькі енергозатрати, використання відходів, високий вихід деяких БАР	Складність масштабування, проблеми з контролем параметрів
Ко-культивування	Змішані культури (бактерії,	Різноманітні субстрати	Комплексні суміші БАР	Синергетичний ефект, унікальні	Складність контролю, потенційна

	гриби, дріжджі)			властивості продуктів	конкуренція між мікрооргані змами
Імобілізов ані системи	Імобілізован і клітини чи ферменти	Різноманітн і субстрати	Специфічні БАР, біотрансформ овані сполуки	Багаторазо ве використан ня біомаси, висока стабільніст ь	Обмеження масоперенос у, складність імобілізації
Високощіль нісне культивуван ня	Високопродук тивні штами	Оптимізова ні середовища	Різноманітні БАР у високій концентрації	Максималь на продуктивн ість, ефективне використан ня простору	Складне обладнання, високі вимоги до контролю

Виробництво біоактивних пептидів шляхом ферментації білкових субстратів є перспективним напрямком біотехнології. Білки молока, сої, яєць та інших джерел можуть бути гідролізовані ферментами або мікроорганізмами з утворенням пептидів з різними біологічними властивостями [40].

Наприклад, ферментація соєвого молока бактеріями *Lactobacillus helveticus* призводить до утворення пептидів з антигіпертензивними властивостями. Ці пептиди інгібують ангіотензин-перетворюючий фермент (АПФ), ключовий фермент у регуляції артеріального тиску [40].

Ферментація молочної сироватки молочнокислими бактеріями призводить до утворення пептидів з імуномодулюючими, антиоксидантними та антимікробними властивостями. Ці пептиди можуть бути використані як функціональні інгредієнти в харчових продуктах або як компоненти нутрицевтиків [40].

Післяферментаційна обробка та виділення БАР є важливим етапом їх виробництва. Залежно від типу БАР та ферментаційного процесу, можуть використовуватися різні методи:

1. центрифугування - для відділення біомаси від культуральної рідини;

2. фільтрація - для очищення від залишків субстрату та клітин;
3. екстракція - для виділення БАР з ферментаційного середовища;
4. хроматографія - для очищення та розділення БАР;
5. ліофілізація - для отримання сухих форм БАР [41].

Для кожного типу БАР розробляють специфічні методи виділення та очищення. Наприклад, для виділення біоактивних пептидів з ферментованої молочної сироватки використовуються ультрафільтрація, іонообмінна хроматографія та гель-фільтрація [41].

Контроль якості БАР, отриманих шляхом ферментації, включає:

1. аналіз хімічного складу (ВЕРХ, мас-спектрометрія);
2. визначення біологічної активності (антиоксидантної, антимікробної, імуномодулюючої);
3. оцінка безпечності (відсутність токсичних сполук, мікробіологічна чистота);
4. стабільність при зберіганні та обробці [42].

Сучасні тенденції у виробництві БАР шляхом ферментації включають:

1. розробку безвідходних технологій;
2. використання генетично модифікованих штамів з підвищеною продуктивністю;
3. впровадження безперервних та напівбезперервних процесів;
4. застосування нових методів моніторингу та контролю процесу;
5. розробку комбінованих процесів ферментації та екстракції [42].

Таким чином, виробництво біологічно активних речовин шляхом ферментації є перспективним напрямком біотехнології, що дозволяє отримувати цінні продукти з природної сировини, включаючи відходи агропромислового виробництва. Оптимізація процесів ферментації та впровадження нових технологій дозволяють підвищувати ефективність виробництва та якість отримуваних БАР.

1.2.3 Сфери застосування біологічно активних речовин (фармацевтика, харчова промисловість, косметологія)

Біологічно активні речовини, отримані шляхом ферментації, знаходять широке застосування у різних галузях, включаючи фармацевтику, харчову промисловість, косметологію та інші. Їх природне походження, висока біологічна активність та відносно низька токсичність роблять ці сполуки привабливими альтернативами синтетичним аналогам [43].

Фармацевтична галузь використовує ферментовані БАР для розробки антибіотиків, імуномодуляторів, ферментних препаратів та пробіотичних засобів. Сучасні дослідження в галузі фармацевтики зосереджені на розробці нових біоактивних сполук з покращеними терапевтичними властивостями та зниженими побічними ефектами. Особливу увагу приділяють біоактивним пептидам, отриманим з ферментованих молочних продуктів, які проявляють антигіпертензивну, антиоксидантну та імуномодулюючу активність [44].

Харчова промисловість є іншою важливою сферою застосування БАР, отриманих шляхом ферментації. Ці речовини використовуються як:

1. функціональні інгредієнти:
 - 1) пребіотики (фруктоолігосахариди, інулін);
 - 2) біоактивні пептиди з антиоксидантними та антигіпертензивними властивостями;
 - 3) поліфеноли з покращеною біодоступністю;
 - 4) нутрицевтики (коензим Q10, поліненасичені жирні кислоти);
2. натуральні консерванти:
 - 1) органічні кислоти (молочна, оцтова);
 - 2) бактеріоцини (нізін, педіоцин);
 - 3) ферментовані екстракти з антимікробними властивостями;
3. ароматизатори та смакові добавки:
 - 1) амінокислоти (глутамінова кислота);
 - 2) нуклеотиди з умами-смаком;
 - 3) складні ефіри та інші ароматичні сполуки;

4. покращувачі структури харчових продуктів:
- 1) екзополісахариди для покращення текстури;
 - 2) ферменти для модифікації структури (трансглютамінази, протеази)
- [45].

У харчовій промисловості особливу увагу приділяють розробці функціональних харчових продуктів, збагачених біоактивними компонентами, отриманими шляхом ферментації. Ці продукти, окрім поживної цінності, мають додаткові корисні властивості для здоров'я [45].

Наприклад, в Ukrainian Food Journal описується використання біоактивних компонентів меду, волоського горіха та обліпихи для створення інноваційних ферментованих молочних продуктів з покращеним ароматичним профілем та антиоксидантними властивостями [45].

На рис. 2.3 представлено основні сфери застосування біоактивних речовин, отриманих шляхом ферментації. [43-47]

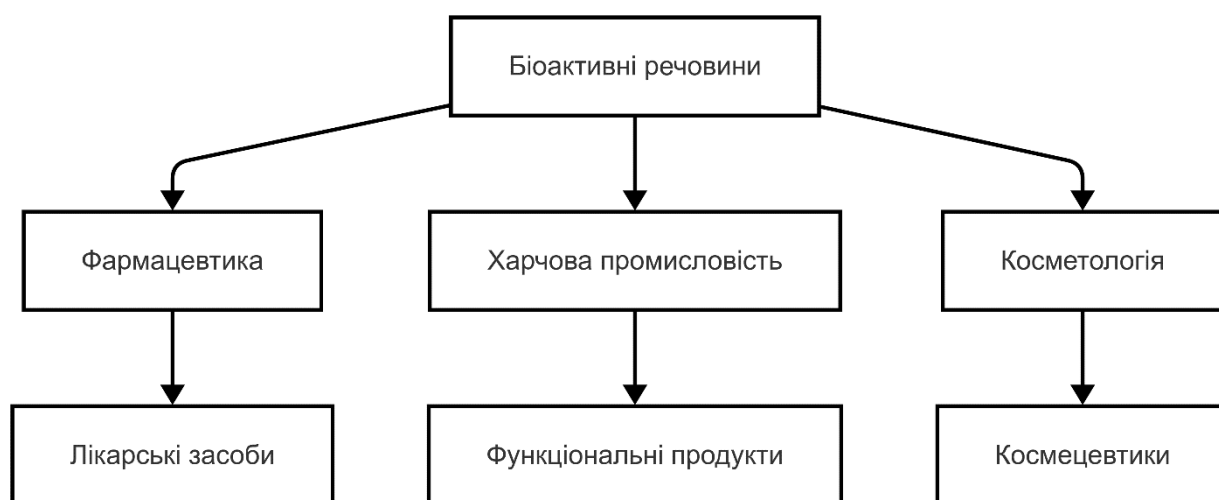


Рис. 2.3 Сфери застосування біоактивних речовин, отриманих шляхом ферментації

Косметологічна промисловість активно використовує БАР, отримані шляхом ферментації, для розробки «космецевтиків» – косметичних продуктів з терапевтичними властивостями. Ці речовини використовуються як:

1. антивікові компоненти:
 - 1) поліфеноли та флавоноїди як антиоксиданти;
 - 2) пептиди, що стимулюють синтез колагену;
 - 3) полісахариди з зволожуючим ефектом;
2. засоби для догляду за проблемною шкірою:
 - 1) ферментовані екстракти з протизапальними властивостями;
 - 2) молочна кислота як відлущуючий агент;
 - 3) біоактивні компоненти з себорегулюючою дією;
3. натуральні консерванти:
 - 1) органічні кислоти;
 - 2) ефірні олії, що утворюються при ферментації;
4. інноваційні косметичні склади:
 - 1) ферментовані екстракти рослин;
 - 2) лізати біфідо- та лактобактерій;
 - 3) екзополісахариди з плівкоутворюючими властивостями [46].

Застосування ферментованих компонентів у косметиці дозволяє покращити біодоступність активних речовин, їх проникнення через шкірний бар'єр та загальну ефективність косметичних продуктів [46].

Косметичні продукти, що містять БАР, отримані шляхом ферментації, зазвичай мають менший алергенний потенціал та кращу переносимість порівняно з синтетичними аналогами. Крім того, вони часто мають багатофункціональну дію, одночасно забезпечуючи антиоксидантний, зволожуючий, протизапальний та інші ефекти [46].

Сільське господарство та екологічні застосування є ще одним важливим напрямком використання БАР, отриманих шляхом ферментації:

1. біопестициди:
 - 1) метаболіти *Bacillus thuringiensis*;
 - 2) антифунгальні компоненти з *Streptomyces*;
 - 3) спіносад з ферментації *Saccharopolyspora spinosa*;
2. біодобрива:

1) ферменти, що покращують доступність фосфору та інших елементів;

2) фітогормони з ферментованих субстратів;

3. екологічна біоремедіація:

1) ферменти для розкладання забруднювачів;

2) біосурфактанти для очищення забруднених ґрунтів та вод [47].

У сільському господарстві БАР, отримані шляхом ферментації, використовуються як альтернатива хімічним пестицидам та добривам. Ці продукти є більш екологічно безпечними та можуть сприяти розвитку стійкого сільського господарства [47].

Регуляторні аспекти та безпека БАР є важливим питанням при їх комерційному застосуванні. Залежно від сфери застосування, БАР можуть підпадати під різні регуляторні категорії:

1. у фармацевтиці - як активні фармацевтичні інгредієнти;

2. у харчовій промисловості - як харчові добавки або функціональні інгредієнти;

3. у косметології - як косметичні інгредієнти [48].

Кожна категорія має свої вимоги щодо безпеки, ефективності та якості. Наприклад, в ЄС функціональні харчові інгредієнти підпадають під регуляцію Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA), яке вимагає наукових доказів заявлених функціональних властивостей [48].

БАР, отримані шляхом ферментації, зазвичай вважаються безпечними (GRAS - Generally Recognized As Safe) завдяки їх природному походженню та тривалій історії використання. Однак, для нових сполук або нових застосувань відомих сполук вимагаються додаткові дослідження безпеки [48].

Майбутні тенденції та перспективи розвитку сфер застосування БАР, отриманих шляхом ферментації, включають:

1. персоналізовані функціональні харчові продукти, розроблені з урахуванням індивідуальних потреб споживачів;

2. нові лікарські форми для доставки БАР до цільових органів та тканин;
3. комбіновані продукти, що містять різні класи БАР з синергетичним ефектом;
4. інтеграція БАР у «розумні» матеріали для косметології та медицини;
5. розширення застосування БАР у екологічних технологіях та біоремедіації [49].

Сучасні дослідження зосереджені на вивченні механізмів дії БАР на молекулярному рівні, що дозволяє розробляти нові застосування та покращувати ефективність існуючих продуктів. Використання омичних технологій (геноміки, протеоміки, метаболоміки) дозволяє виявляти нові біоактивні сполуки та передбачати їх потенційні біологічні ефекти [49].

Економічні аспекти виробництва та застосування БАР також є важливим фактором розвитку цієї галузі. Зростаючий попит на натуральні та функціональні продукти стимулює інвестиції у розробку нових БАР та технологій їх виробництва [50].

Оцінка економічної ефективності виробництва БАР шляхом ферментації включає аналіз вартості сировини, витрат на виробництво, виходу цільових продуктів та їх ринкової вартості. Використання відходів агропромислового виробництва як субстратів для ферментації може суттєво знизити вартість виробництва та зробити процес більш стійким з екологічної точки зору [50].

Ферментація відкриває шлях до створення цінних продуктів з відходів харчової промисловості, таких як молочна сироватка, фруктовий та овочевий жмих, відходи виробництва соків та вин. Це дозволяє не лише знизити негативний вплив на навколишнє середовище, але й отримати додаткову економічну вигоду [50].

Формула для розрахунку економічної ефективності виробництва БАР може бути представлена як:

$$\text{Економічна ефек.} = \frac{\text{Вартість отриманих БАР} - \text{Витрати на виробництво}}{\text{Витрати на виробництво}} \times 100\%, \quad (5)$$

де:

1. Вартість отриманих БАР - ринкова вартість БАР, отриманих шляхом ферментації;
2. Витрати на виробництво - включають вартість сировини, енергії, робочої сили та інших факторів виробництва.

Важливим аспектом є також комерціалізація та масштабування виробництва БАР. Перехід від лабораторних досліджень до промислового виробництва вимагає вирішення багатьох технічних та економічних питань, включаючи оптимізацію процесів ферментації, розробку ефективних методів виділення та очищення БАР, забезпечення відповідності регуляторним вимогам [50].

Таким чином, біологічно активні речовини, отримані шляхом ферментації, мають широкий спектр застосувань у різних галузях промисловості, від фармацевтики до сільського господарства. Їх природне походження, висока біологічна активність та відносно низька токсичність роблять ці сполуки привабливими альтернативами синтетичним аналогам. Розвиток нових технологій виробництва та розширення спектру застосування БАР відкривають нові можливості для інновацій та сталого розвитку різних галузей промисловості.

1.3 Процеси ферментації: технології та обладнання

1.3.1 Основні технології ферментації (поточкова, партійна, безперервна)

Сучасні технології ферментації характеризуються різноманітністю підходів та методів, які обираються залежно від характеру цільового продукту, типу використовуваних мікроорганізмів та економічних факторів. Ключовою класифікацією промислових ферментаційних технологій є поділ за режимом

проведення процесу, що суттєво впливає на продуктивність, якість отриманих біоактивних речовин та економічні показники виробництва.

Періодична (партіонна) ферментація представляє собою найпоширеніший тип ферментації, при якому весь процес проводиться в закритій системі з одноразовим завантаженням сировини та поживних компонентів. Характерними особливостями цього методу є простота управління та контролю, низький ризик контамінації, можливість обробки різних субстратів. Тривалість процесу зазвичай варіюється від 1 до 14 днів, залежно від цільового продукту. Після завершення процесу біореактор повністю спорожнюється, стерилізується і завантажується заново [13].

Партіонна технологія широко використовується у виробництві антибіотиків, ферментованих харчових продуктів та біоактивних метаболітів. Її економічна ефективність визначається низкою факторів, включаючи вартість обладнання, енергоспоживання та продуктивність праці. Важливою перевагою є гнучкість системи, що дозволяє швидко переходити від виробництва одного продукту до іншого без суттєвих змін у технологічному процесі.

Напівнеперервна (fed-batch) ферментація є модифікацією періодичного процесу, при якій відбувається поступове додавання субстрату або поживних речовин у біореактор без видалення культуральної рідини. Основними перевагами цього підходу є контроль швидкості росту мікроорганізмів, зниження катаболітної репресії, запобігання субстратному інгібуванню, підвищений вихід продукту та збільшена щільність клітин.

Ця технологія особливо ефективна при виробництві рекомбінантних білків, отриманні висококонцентрованої біомаси, виробництві органічних кислот та промислових ферментів. Дослідження, описані в роботі Yang et al. [11], демонструють ефективність оптимізації fed-batch ферментації для виробництва 2-кето-L-гулонової кислоти (2-KGA), прекурсора вітаміну C, із застосуванням прогнозуючих моделей на основі штучного інтелекту.

Неперервна (continuous) ферментація характеризується постійним надходженням свіжого поживного середовища в біореактор з одночасним видаленням відповідного об'єму культуральної рідини, що дозволяє підтримувати постійний об'єм. Ключовими перевагами цього методу є висока продуктивність, стабільні умови процесу та можливість автоматизації. Економічні показники покращуються завдяки значному зниженню витрат на очищення та підготовку обладнання. Втім, існують ризики генетичної мінливості мікроорганізмів при тривалому культивуванні та підвищений ризик контамінації [13].

Неперервна ферментація широко застосовується у виробництві етанолу, при очищенні стічних вод, виробництві дріжджової біомаси, біосинтезі амінокислот та органічних кислот. Економічна ефективність цього підходу особливо висока у великомасштабних виробництвах з високим об'ємом продукції.

Окремого розгляду потребують іммобілізовані системи, що представляють собою особливий тип технології, при якому мікроорганізми або ферменти фіксуються на носії або в матриці. Характерними перевагами таких систем є підвищена стабільність біокатализаторів, багаторазове використання біомаси, висока щільність клітин, можливість неперервного процесу з високою швидкістю потоку та захист мікроорганізмів від несприятливих умов.

Іммобілізовані системи знаходять застосування у виробництві органічних кислот, біотрансформаціях стероїдів та інших складних сполук, а також у біореакторах з порожнистим волокном. Твердофазна ферментація (Solid-state fermentation, SSF) – це окремий тип технології, при якому мікроорганізми ростуть на вологому твердому субстраті без вільної води. Цей підхід імітує природні умови росту мікроорганізмів, має низькі енергозатрати та забезпечує високу концентрацію продукту [10].

Твердофазна ферментація використовується при виробництві ферментів (амілази, целюлази, протеази), біоактивних сполук із грибів, ферментованих

харчових продуктів (темпе, м'ясо, кава) та при біоремедіації ґрунтів. Європейські дослідники активно розвивають цей напрямок, зокрема для отримання біоактивних сполук із агропромислових відходів, як зазначено у дослідженнях Olmo et al. [10].

Важливо зазначити, що вибір технології ферментації залежить від багатьох факторів, включаючи характеристики цільового продукту, властивості використовуваних мікроорганізмів, доступність сировини та економічні міркування. Часто найбільш ефективним рішенням є комбінація різних технологій або модифікація існуючих підходів відповідно до конкретних вимог виробництва.

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика основних технологій ферментації

Параметр	Періодична ферментація	Напівнеперервна ферментація	Неперервна ферментація
Принцип роботи	Одноразове завантаження, повний цикл в одному біореакторі	Поступове додавання субстрату без видалення культуральної рідини	Постійне введення поживного середовища одночасним видаленням культуральної рідини
Продуктивність	Середня	Висока	Дуже висока
Капітальні витрати	Низькі	Середні	Високі
Операційні витрати	Середні (висока вартість очищення)	Середні	Низькі (менші витрати на очищення)
Ризик контамінації	Низький	Середній	Високий
Складність управління	Низька	Середня	Висока
Гнучкість виробництва	Висока	Середня	Низька

Сучасні тенденції розвитку ферментаційних технологій спрямовані на підвищення ефективності та продуктивності процесів, зниження енерговитрат та мінімізацію впливу на навколишнє середовище. Зокрема, активно розвиваються гібридні технології, що поєднують переваги різних підходів, а також системи з покращеним масообміном та автоматизованим контролем параметрів процесу. Впровадження методів математичного моделювання та

оптимізації дозволяє підвищити ефективність ферментаційних процесів та забезпечити високу якість цільових біоактивних речовин.

Сучасне обладнання для ферментації включає біореактори різних типів з автоматизованими системами контролю температури, рН, аерації та моніторингу процесу, що забезпечує оптимальні умови для синтезу біоактивних речовин.

1.3.2 Умови проведення ферментації (температура, рН, аерація)

Ефективність ферментаційного процесу значною мірою залежить від підтримання оптимальних фізико-хімічних умов середовища. Температура, рН та аерація є ключовими параметрами, що визначають швидкість росту мікроорганізмів, їх метаболічну активність та вихід цільових біоактивних речовин. Оптимізація цих параметрів є критично важливою для максимізації продуктивності ферментаційних процесів.

Температура є одним із найважливіших параметрів, що впливають на ферментаційні процеси, оскільки безпосередньо впливає на швидкість росту мікроорганізмів, їх метаболічну активність та вихід цільових продуктів. Вплив температури на ферментаційний процес проявляється у кількох аспектах: вона визначає швидкість ферментативних реакцій, впливає на розчинність газів (особливо кисню), впливає на стабільність продуктів та може змінювати метаболічний профіль мікроорганізмів [20].

Для різних мікроорганізмів характерні різні оптимальні температурні режими: психрофільні процеси відбуваються при 5-20°C (деякі види *Pseudomonas*), мезофільні процеси – при 20-45°C (більшість промислових ферментацій), термофільні процеси – при 45-70°C (*Bacillus stearothermophilus*, *Thermus spp.*), екстремально термофільні – при температурі вище 70°C (*Thermococcus*, *Pyrococcus*). Вибір температурного режиму залежить від типу використовуваних мікроорганізмів та характеристик цільових продуктів [20].

У дослідженні оптимізації ферментації ягідного жмиху [18] було встановлено, що оптимальною температурою для ферментації змішаними

культурами молочнокислих бактерій та дріжджів є 30°C. Ця температура забезпечує оптимальний баланс між швидкістю росту мікроорганізмів та стабільністю біоактивних сполук.

Рівень рН середовища суттєво впливає на активність мікроорганізмів та стабільність біоактивних сполук. Вплив рН на процес ферментації проявляється у визначенні активності ферментів, впливі на морфологію мікроорганізмів, впливі на проникність клітинних мембран, зміні розчинності компонентів середовища та впливі на стабільність продуктів [20].

Для різних типів ферментації характерні різні оптимальні діапазони рН: ацидофільні процеси відбуваються при рН 1-5,5 (дріжджі, молочнокислі бактерії), нейтральні процеси – при рН 5,5-8,0 (багато бактерій, включаючи *E. coli*), алкалофільні процеси – при рН вище 8,0 (*Bacillus alcalophilus*). Підтримання оптимального значення рН є критично важливим для ефективності ферментаційного процесу [5].

Для контролю рН використовуються різні стратегії, включаючи буферні системи, автоматичне дозування кислот/основ, контрольоване додавання субстратів, іонообмінні смоли та рН-статкування (підтримання постійного рН). Вибір стратегії залежить від типу ферментаційного процесу, характеристик використовуваних мікроорганізмів та економічних міркувань [5].

Аерація є ключовим фактором для аеробних ферментаційних процесів та суттєво впливає на метаболізм мікроорганізмів. Функції аерації включають забезпечення киснем для дихання, видалення CO₂ та інших летких метаболітів, регулювання температури через випарне охолодження та допоміжну роль у перемішуванні [36].

Ключовими параметрами аерації є швидкість аерації (VVM - об'єм повітря на об'єм середовища за хвилину), коефіцієнт масопередачі кисню (kLa), розчинений кисень (DO%) та спосіб аерації (барботаж, поверхнева аерація, мембранна аерація). Оптимізація аерації є складним завданням, що вимагає врахування багатьох факторів, включаючи кисневі потреби мікроорганізмів, характеристики біореактора та економічні міркування [36].

У дослідженні [14] з оптимізації ферментації *Streptomyces yanglinensis* для виробництва протигрибкових речовин було проведено аналіз впливу швидкості аерації на синтез біоактивних сполук. Оптимальна швидкість аерації склала 1,0-1,5 л/хв, що забезпечувало максимальну продукцію протигрибкових речовин.

Перемішування забезпечує гомогенність середовища та покращує масообмін у біореакторі. Функції перемішування включають суспендування клітин та твердих частинок, рівномірний розподіл поживних речовин, покращення тепло- та масообміну, диспергування газових бульбашок (для аеробних процесів). Ключовими параметрами перемішування є швидкість перемішування (об/хв), тип та геометрія мішалки, споживана потужність та зсувні зусилля [37].

Склад середовища та наявність необхідних поживних речовин мають вирішальне значення для успішного проведення ферментації. Ключові компоненти середовищ включають джерела вуглецю (глюкоза, сахароза, крохмаль, гліцерин, рослинні олії), джерела азоту (амонійні солі, нітрати, амінокислоти, пептони, дріжджовий екстракт), мінеральні елементи (фосфор, калій, магній, кальцій, залізо), мікроелементи (цинк, марганець, мідь, кобальт, молібден) та фактори росту (вітаміни, амінокислоти, пурини, піримідини) [38].

Індуктори та прекурсори – сполуки, що активують синтез цільових продуктів, попередники в біосинтетичних шляхах та регулятори метаболізму – також відіграють важливу роль у ферментаційних процесах. Їх правильний вибір та оптимальна концентрація можуть суттєво підвищити вихід цільових біоактивних речовин [38].

Окрім основних параметрів, значний вплив на ферментаційні процеси мають осмотичний тиск та іонна сила, що впливають на мембранний транспорт та можуть викликати осмотичний стрес. Ці параметри регулюються додаванням солей або осмопротекторів. Для фотосинтезуючих мікроорганізмів важливим є світловий режим, що може впливати на циркадні ритми та експресію генів. Окисно-відновний потенціал (Redox) впливає на

метаболічні шляхи та є особливо важливим для анаеробних та мікроаерофільних процесів [25].

Оптимізація умов проведення ферментації є комплексним завданням, що вимагає врахування взаємозв'язків між різними параметрами. Важливо розуміти, що параметри ферментації не є незалежними – зміна одного параметра може впливати на інші. Наприклад, збільшення швидкості перемішування підвищує масоперенос кисню, але може збільшити зсувні зусилля та пошкодити клітини; підвищення температури збільшує швидкість реакцій, але може дестабілізувати ферменти та продукти; збільшення концентрації субстратів може призвести до субстратного інгібування [25].

У дослідженні [12] з оптимізації вилучення біоактивних сполук з морських побічних продуктів були виявлені складні взаємодії між параметрами процесу, що вимагали застосування статистичних методів для визначення оптимальних умов. Ці результати підкреслюють важливість системного підходу до оптимізації умов ферментації.

Таким чином, успішне проведення ферментаційних процесів для виробництва біоактивних речовин вимагає ретельного вибору та підтримання оптимальних умов, включаючи температуру, рН, аерацію та склад середовища. Розуміння взаємозв'язків між різними параметрами та їх впливу на активність мікроорганізмів є ключовим для максимізації виходу та якості цільових продуктів.

1.4 Оптимізація процесів ферментації

1.4.1 Параметри, що впливають на ефективність ферментації

Ефективність ферментаційних процесів залежить від численних параметрів, які можна розділити на кілька категорій: біологічні, фізико-хімічні, технологічні та економічні. Комплексний аналіз цих параметрів дозволяє розробити стратегії оптимізації для максимізації виходу цільових біоактивних речовин при мінімальних витратах.

Біологічні параметри включають вибір мікроорганізму, фізіологічний стан інокуляту та метаболічні особливості. Вибір мікроорганізму є ключовим фактором успіху ферментаційного процесу. Продуктивність штаму, генетична стабільність, стійкість до несприятливих умов та специфічність синтезу цільового продукту визначають потенційний вихід біоактивних речовин. Сучасні біотехнологічні підходи дозволяють створювати генетично модифіковані штами з підвищеною продуктивністю та стабільністю, що суттєво впливає на економічну ефективність процесу.

Фізіологічний стан інокуляту, включаючи фазу росту, щільність клітин, вік культури та адаптацію до ферментаційного середовища, також критично впливає на ефективність процесу. Дослідження показують, що використання інокуляту в логарифмічній фазі росту з оптимальною щільністю клітин забезпечує більш швидку адаптацію та вищу продуктивність ферментаційного процесу. Правильна підготовка інокуляту може скоротити лаг-фазу та збільшити загальну продуктивність процесу.

Метаболічні особливості мікроорганізмів, включаючи шляхи біосинтезу цільового продукту, регуляторні механізми, наявність конкуруючих метаболічних шляхів та метаболічне навантаження, визначають ефективність трансформації субстрату в цільовий продукт. Розуміння метаболічних шляхів дозволяє розробляти стратегії для оптимізації виходу цільових біоактивних речовин, наприклад, шляхом інактивації конкуруючих шляхів або посилення експресії ключових ферментів.

Фізико-хімічні параметри включають параметри середовища та фізичні умови. Концентрація та тип джерела вуглецю, концентрація та тип джерела азоту, співвідношення C

, наявність мікроелементів та факторів росту, буферна ємність середовища – всі ці фактори суттєво впливають на ефективність ферментаційного процесу. Оптимізація складу середовища є одним з найбільш ефективних підходів до підвищення продуктивності.

Згідно з дослідженнями Singh et al. [6], оптимізація складу середовища з використанням статистичних методів може підвищити вихід цільового продукту на 30-50%. Наприклад, оптимізація джерела вуглецю та азоту для виробництва актиноміцину D з *Streptomyces sindenensis* з використанням методології поверхні відгуку призвела до 2,8-кратного збільшення виходу продукту.

Фізичні умови, такі як температура, рН, розчинений кисень, перемішування, аерація, тиск, піноутворення та антипінні агенти, також критично впливають на ефективність ферментаційного процесу. Підтримання оптимальних значень цих параметрів є ключовим для максимізації виходу цільових біоактивних речовин. Дослідження Huang et al. [14] з оптимізації ферментації *Streptomyces yanglinensis* для виробництва протигрибкових речовин показали, що оптимізація аерації та перемішування може збільшити вихід активних сполук на 40-60%.

Часові параметри, включаючи тривалість процесу, час підживлення в fed-batch процесах, швидкість потоку в безперервних процесах та час аерації/анаеробної фази, також впливають на кінцевий вихід продукту. Оптимізація цих параметрів дозволяє максимізувати продуктивність процесу та мінімізувати витрати. Наприклад, у дослідженні виробництва біоактивних пептидів з молочної сироватки було показано, що оптимізація тривалості процесу та режиму підживлення дозволила збільшити вихід цільових пептидів на 45%.

Технологічні параметри включають конструкцію біореактора, режим проведення процесу та масштаб процесу. Геометричні співвідношення, тип та розташування перемішуючих пристроїв, система аерації, система контролю температури – всі ці фактори впливають на ефективність масо- та теплообміну в біореакторі, що, в свою чергу, визначає швидкість росту мікроорганізмів та синтезу цільових продуктів.

Режим проведення процесу (періодичний, напівперіодичний, безперервний, багатостадійний) також суттєво впливає на продуктивність та

економічну ефективність. Наприклад, перехід від періодичного до напівперіодичного режиму з оптимізованими стратегіями підживлення може збільшити кінцеву концентрацію продукту в 2-3 рази. У дослідженні Yang et al. [11] було показано, що використання напівперіодичного режиму з оптимізованою стратегією підживлення дозволило підвищити вихід 2-кетогулонової кислоти на 35% порівняно з періодичним режимом.

Масштаб процесу (лабораторний, пілотний, промисловий) та фактори масштабування також впливають на ефективність ферментаційного процесу. При масштабуванні важливо зберегти ключові параметри процесу, такі як коефіцієнт масопередачі кисню (kLa), інтенсивність перемішування та гідродинамічні характеристики біореактора. Неправильне масштабування може призвести до значного зниження продуктивності процесу.

Економічні параметри включають вартість субстратів, енергетичні витрати, продуктивність процесу та вартість виділення та очищення продукту. Вартість субстратів є важливим фактором, що впливає на економічну ефективність ферментаційного процесу. Використання недорогих джерел вуглецю та азоту, можливість використання відходів виробництв та вартість спеціалізованих добавок – всі ці фактори впливають на собівартість кінцевого продукту.

Енергетичні витрати на перемішування, аерацію, підтримання температури та стерилізацію також суттєво впливають на економічну ефективність процесу. Оптимізація енергоспоживання є важливим напрямком підвищення економічної ефективності ферментаційних процесів. Наприклад, використання більш ефективних систем перемішування та аерації може знизити енергоспоживання на 15-25%.

Продуктивність процесу, включаючи вихід продукту, продуктивність, селективність та тривалість циклу, безпосередньо впливає на економічну ефективність. Підвищення продуктивності дозволяє знизити собівартість цільового продукту та підвищити конкурентоспроможність виробництва.

Наприклад, підвищення виходу продукту на 20% при тій же вартості субстратів та енергії може знизити собівартість на 15-18%.

Вартість виділення та очищення продукту, включаючи складність процесу очищення, вихід на стадії очищення та необхідний ступінь чистоти, також є важливим економічним фактором. У багатьох випадках вартість процесів виділення та очищення може становити 50-80% від загальної вартості виробництва. Оптимізація цих процесів є важливим напрямком підвищення економічної ефективності.

Взаємозв'язок параметрів ферментації є важливим аспектом, який необхідно враховувати при оптимізації. Параметри ферментації не є незалежними – зміна одного параметра може вплинути на інші. Наприклад, збільшення швидкості перемішування підвищує масоперенос кисню, але може збільшити зсувні зусилля та пошкодити клітини; підвищення температури збільшує швидкість реакцій, але може дестабілізувати ферменти та продукти; збільшення концентрації субстратів може призвести до субстратного інгібування.

У дослідженні Tsegay et al. [12] з оптимізації вилучення біоактивних сполук з морських побічних продуктів були виявлені складні взаємодії між параметрами процесу, що вимагали застосування статистичних методів для визначення оптимальних умов. Ці результати підкреслюють важливість системного підходу до оптимізації ферментаційних процесів.

Таким чином, ефективність ферментаційних процесів залежить від численних взаємопов'язаних параметрів біологічного, фізико-хімічного, технологічного та економічного характеру. Комплексний аналіз та оптимізація цих параметрів є ключовими для максимізації виходу цільових біоактивних речовин при мінімальних витратах.

1.4.2 Методи оптимізації (статистичні методи, методи експериментального планування)

Оптимізація процесів ферментації потребує систематичного підходу для визначення оптимальних умов виробництва біоактивних речовин. Сучасні методи оптимізації можна розділити на кілька категорій, включаючи традиційні методи, статистичні методи експериментального планування, методи машинного навчання та штучного інтелекту, а також гібридні підходи.

Традиційні методи оптимізації включають метод «один фактор за один раз» (One-factor-at-a-time, OFAT), методи виключення компонентів та методи доповнення. Метод OFAT передбачає послідовну зміну одного параметра при фіксованих значеннях інших. Цей підхід має свої переваги, такі як простота та інтуїтивна зрозумілість, але має і суттєві недоліки: він не враховує взаємодію факторів, вимагає великих часових витрат та може не знайти глобальний оптимум.

Методи виключення компонентів передбачають виключення окремих компонентів середовища для визначення їх важливості. Цей підхід застосовується для первинного скринінгу компонентів середовища та дозволяє визначити критичні компоненти, без яких неможливий успішний процес ферментації. Методи доповнення передбачають додавання різних компонентів до базового середовища та використовуються для визначення лімітуючих факторів.

Статистичні методи експериментального планування (Design of Experiments, DOE) є більш ефективними та дозволяють враховувати взаємодію між різними факторами. Факторіальні експерименти, включаючи повний факторіальний дизайн (всі комбінації рівнів факторів) та дробний факторіальний дизайн (частина комбінацій), дозволяють оцінити головні ефекти та взаємодії між факторами. Ці методи широко використовуються для оптимізації складу середовища та умов ферментації.

Скринінгові методи, такі як дизайн Плакетта-Бурмана (Plackett-Burman design), дозволяють визначити найбільш значущі фактори при мінімальній

кількості експериментів. Цей підхід є особливо ефективним на початкових етапах оптимізації, коли необхідно визначити критичні фактори з великої кількості потенційно важливих параметрів. Як зазначено в дослідженні Singh et al. [6], дизайн Плакетта-Бурмана дозволяє скоротити кількість експериментів з факторіального $2^7 = 128$ до всього 12 експериментів при дослідженні 7 факторів.

Методи поверхні відгуку (Response Surface Methodology, RSM) є потужним інструментом для оптимізації процесів ферментації. Центральний композиційний дизайн (Central Composite Design, CCD), Бох-Бенкен дизайн та Дюелерт дизайн дозволяють побудувати математичну модель залежності виходу продукту від факторів. Ці методи ефективні для знаходження оптимальних умов та розуміння взаємодій між факторами.

Як зазначається в дослідженні European Journal of Microbiology, RSM надає квадратичну модель, яка може точно передбачити оптимальні умови. Наприклад, у дослідженні виробництва актиноміцину D використання комбінації дизайну Plackett-Burman та RSM призвело до 2,8-кратного збільшення виходу продукту. Математична модель, отримана за допомогою RSM, дозволяє визначити оптимальні умови ферментації без необхідності проведення великої кількості експериментів.

Методи машинного навчання та штучного інтелекту стають все більш популярними для оптимізації процесів ферментації. Штучні нейронні мережі (ANN) дозволяють моделювати складні нелінійні залежності, що характерні для біологічних систем. Вони відзначаються високою точністю прогнозування при наявності достатньої кількості даних та здатністю працювати з «зашумленими» даними, що особливо цінно для біотехнологічних процесів.

У дослідженні Journal of Peptide Research and Therapeutics [9] порівнювалися методи RSM та ANN для оптимізації умов ферментації при виробництві гліколіпептиду. Нейронна мережа, навчена з використанням алгоритму Левенберга-Маркуардта, показала кращі результати ($R^2 = 0,9964$, $MSE = 1,7844$) порівняно з RSM ($R^2 = 0,9923$, $MSE = 3,6661$). Ці результати

підтверджують високу ефективність методів машинного навчання для оптимізації складних біологічних процесів.

Генетичні алгоритми (GA) представляють собою еволюційний підхід до оптимізації, що базується на принципах природного відбору. Ці методи ефективні для знаходження глобального оптимуму в складних багатовимірних просторах та часто використовуються в комбінації з ANN (ANN-GA). Генетичні алгоритми дозволяють досліджувати великий простір параметрів та знаходити оптимальні умови навіть для складних нелінійних систем.

Байєсівська оптимізація є ефективним підходом для оптимізації «чорного ящика», особливо коли експериментальні дослідження є дорогими або трудомісткими. Ця методологія балансує між дослідженням та експлуатацією простору параметрів, що дозволяє мінімізувати кількість необхідних експериментів. У дослідженні Yang et al. [11] застосовувався байєсівський підхід до оптимізації глибоких нейронних мереж (BODNN) для прогнозування утворення продукту в процесі ферментації 2-кето-L-гулонової кислоти, що дозволило створити більш точну та надійну модель прогнозування.

Інші методи оптимізації, такі як метод рою частинок (Particle Swarm Optimization, PSO), метод імітації відпалу (Simulated Annealing) та метод Нелдера-Міда (Nelder–Mead simplex), також застосовуються для оптимізації процесів ферментації. Ці методи мають свої переваги та недоліки, і вибір оптимального методу залежить від конкретної задачі оптимізації.

Гібридні підходи, що комбінують різні методи оптимізації, часто дають найкращі результати. Такі підходи дозволяють використовувати переваги різних методів та компенсувати їх недоліки. Наприклад, комбінація DOE та ANN передбачає використання експериментального дизайну для отримання структурованих даних та нейронних мереж для моделювання та оптимізації.

Комбінація ANN-GA передбачає використання нейронних мереж для побудови моделі та генетичних алгоритмів для оптимізації параметрів. Цей підхід є особливо ефективним для складних нелінійних систем, таких як

ферментаційні процеси. У дослідженні виробництва актиноміцину V застосування інтегрованого підходу з використанням штучних нейронних мереж у поєднанні з генетичними алгоритмами (ANN-GA) для оптимізації середовища дозволило збільшити вихід продукту з 110 мг/л до 452 мг/л, що представляє собою більш ніж чотирикратне збільшення продуктивності.

Комбінація механістичних та емпіричних моделей передбачає використання механістичних моделей на основі балансів маси та емпіричних кореляцій для невідомих параметрів. Цей підхід дозволяє інтегрувати знання про біохімічні шляхи з емпіричними даними, що підвищує точність та надійність моделей.

Оптимізація в реальному часі є важливим напрямком для промислових процесів. Модельне прогнозує управління (Model Predictive Control, MPC) використовує модель процесу для прогнозування майбутньої поведінки та оптимізації управляючих впливів в реальному часі. Цей підхід дозволяє враховувати обмеження та цільові функції, що особливо важливо для складних біотехнологічних процесів.

Безперервна оптимізація процесу передбачає автоматичне коригування параметрів на основі онлайн-аналізу. Цей підхід використовує датчики та аналітичні прилади для моніторингу ключових параметрів процесу та адаптивні алгоритми управління для оптимізації умов ферментації в реальному часі. «М'які сенсори» (Soft sensors) дозволяють оцінювати недоступні для прямого вимірювання параметри на основі непрямих вимірювань та математичних моделей, що дозволяє контролювати критичні параметри процесу.

Для оцінки ефективності оптимізації використовуються різні метрики, включаючи продуктивність (концентрація продукту, вихід продукту на одиницю субстрату, об'ємна продуктивність), статистичні метрики (коефіцієнт детермінації (R^2), середньоквадратична помилка (MSE), абсолютне середнє відхилення (AAD), F-критерій для оцінки адекватності

моделі) та економічні показники (витрати на одиницю продукту, загальна рентабельність процесу, енергоефективність).

Таблиця 4.2

Порівняння методів оптимізації процесів ферментації

Метод	Переваги	Недоліки	Сфера застосування
Один фактор за один раз (OFAT)	Простота, інтуїтивна зрозумілість	Не враховує взаємодію факторів, трудомісткість, може не знайти глобальний оптимум	Початкова оптимізація, прості системи
Дизайн Плакетта-Бурмана	Ефективний скринінг значущих факторів при мінімальній кількості експериментів	Не дозволяє визначити оптимальні умови	Початковий скринінг факторів
Методологія поверхні відгуку (RSM)	Дозволяє побудувати математичну модель, враховує взаємодію факторів	Обмежена точність для складних нелінійних систем	Оптимізація кількох факторів, побудова моделей
Штучні нейронні мережі (ANN)	Висока точність для складних нелінійних систем, робота з «зашумленими» даними	Вимагає великої кількості даних, «чорний ящик»	Моделювання складних систем з великою кількістю даних
Генетичні алгоритми (GA)	Ефективний пошук глобального оптимуму, не вимагає градієнтної інформації	Висока обчислювальна складність, стохастичний характер	Оптимізація складних багатовимірних функцій
Байєсівська оптимізація	Ефективне використання експериментальних даних, балансування між дослідженням та експлуатацією	Складна імплементація, висока обчислювальна складність	Оптимізація «чорного ящика» при обмеженій кількості експериментів
Гібридні підходи (ANN-GA, DOE-ANN)	Комбінують переваги різних методів, висока ефективність	Складність, вимагають експертних знань	Складні системи з нелінійною поведінкою

Вибір методу оптимізації залежить від багатьох факторів, включаючи складність системи, кількість параметрів, доступність експериментальних ресурсів та необхідну точність. Для простих систем з малою кількістю параметрів традиційні методи можуть бути достатніми. Для складних систем з багатьма взаємодіючими параметрами більш підходящими є статистичні

методи експериментального планування, методи машинного навчання та гібридні підходи.

Системний підхід до оптимізації процесів ферментації повинен включати визначення ключових параметрів, вибір відповідного методу оптимізації, проведення експериментів згідно з обраним планом, аналіз результатів, побудову моделі та визначення оптимальних умов. Такий підхід дозволяє максимізувати вихід цільових біоактивних речовин при мінімальних витратах ресурсів та часу.

1.4.3 Приклади успішної оптимізації процесів ферментації

Практичне застосування методів оптимізації ферментаційних процесів демонструє їх високу ефективність у контексті промислового виробництва біоактивних речовин. Аналіз конкретних прикладів дозволяє виявити найбільш перспективні підходи та оцінити їх потенціал для різних типів ферментаційних процесів.

Дослідження з оптимізації виробництва актиноміцину D з *Streptomyces sindenensis* із застосуванням комбінації дизайну Plackett-Burman та методології поверхні відгуку (RSM) продемонструвало 2,8-кратне збільшення виходу продукту. Основними факторами, що підлягали оптимізації, були концентрація соєвого борошна, глюкози та NaCl, а також рН середовища. Результати цього дослідження підтверджують ефективність статистичних методів планування експерименту для оптимізації складу живильного середовища та умов ферментації [31].

В іншому дослідженні застосування інтегрованого підходу з використанням штучних нейронних мереж у поєднанні з генетичними алгоритмами (ANN-GA) для оптимізації середовища дозволило збільшити вихід актиноміцину V з 110 мг/л до 452 мг/л, що представляє собою більш ніж чотирикратне збільшення продуктивності. Цей приклад демонструє потенціал сучасних методів машинного навчання для моделювання складних біологічних систем та оптимізації виробничих процесів [32].

Приклад оптимізації виробництва хітинази з *Alealigenes xylosoxydans* продемонстрував 1,4-кратне збільшення виходу ферменту при застосуванні статистичних методів оптимізації. Ключовими факторами були визначені джерело вуглецю (хітин), концентрація інокуляту та швидкість аерації. Цей приклад підкреслює важливість оптимізації не лише складу середовища, але й параметрів процесу ферментації, таких як аерація та концентрація біомаси [39]. Систематична оптимізація дозволяє підвищити вихід цільових продуктів у 2-4 рази та знизити собівартість на 20-35%, що підтверджує економічну доцільність впровадження оптимізованих процесів.

Важливим аспектом оптимізації є успішне масштабування від лабораторного до промислового рівня. У дослідженнях показано, що застосування методів DOE та машинного навчання дозволяє не лише оптимізувати умови на лабораторному рівні, але й передбачити поведінку процесу при збільшенні масштабу. Критичними параметрами для успішного масштабування є kLa (коефіцієнт масопереносу кисню), потужність перемішування на одиницю об'єму та гідродинамічні характеристики біореактора [23].

Згідно з оцінками галузевих експертів, систематична оптимізація може підвищити рентабельність біотехнологічних виробництв на 20-30% за рахунок більш ефективного використання ресурсів та збільшення продуктивності. Це підтверджує не лише наукову, але й комерційну цінність методів оптимізації ферментаційних процесів для виробництва біоактивних речовин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Опис об'єкта дослідження

Об'єктом дослідження обрано комплексні ферментаційні процеси, спрямовані на отримання біологічно активних речовин із застосуванням різних класів ферментних препаратів. Цей вибір зумовлений необхідністю всебічного вивчення механізмів ферментативної трансформації природної сировини та оптимізації технологічних параметрів для максимізації виходу цільових продуктів.

Дослідження охоплює три основні напрямки ферментативних процесів, що представляють найбільший практичний інтерес для сучасної біотехнології. Перший напрямок стосується ферментативного гідролізу білкових субстратів молочної сироватки з використанням протеолітичних ферментних препаратів різного походження. Особливий акцент зроблено на дослідженні активності пепсину тваринного походження, папаїну рослинного походження та мікробного препарату Протолад, отриманого з селекційних штамів *Bacillus subtilis* [19].

Другий напрямок присвячений ферментативному синтезу біодизельного палива за допомогою ліпаз різного мікробного походження. Цей процес характеризується складними взаємодіями між трьома фазами реакційного середовища: олійною сировиною, спиртом та ферментним препаратом. Дослідження включає використання іммобілізованих препаратів ліпаз з *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* та *Thermomyces lanuginosa*, що забезпечує можливість багаторазового використання біокаталізаторів [56].

Третій напрямок зосереджений на вдосконаленні технології пресового вилучення олії з насіння ріпаку з попередньою ферментативною обробкою м'ятки. Процес передбачає використання комбінованих ферментних препаратів целюлозолітичної та протеолітичної дії, що сприяє руйнуванню клітинних стінок та підвищенню доступності олійних включень [57].

Таблиця 2.1 демонструє основні характеристики досліджуваних об'єктів та їх специфічні особливості.

Характеристика об'єктів дослідження

Тип процесу	Субстрат	Ферментний препарат	Цільовий продукт	Температурний діапазон, °С
Гідроліз білків	Концентрат сироваткових білків	Пепсин, папаїн, Протолад	Біоактивні пептиди	40-60
Трансестерифікація	Рослинні олії	Ліпази (СА, РС, ТЛ)	Біодизель	30-55
Обробка насіння	Ріпакова м'ятка	Целюлад + Протолад	Олія високого виходу	40-45

Варто зазначити, що всі досліджувані процеси характеризуються складною кінетикою та нелінійними залежностями між технологічними параметрами. Це вимагає застосування сучасних статистичних методів для планування експериментів та оптимізації умов проведення ферментаційних процесів.

Особливу увагу приділено дослідженню стабільності ферментних препаратів в умовах тривалого використання, оскільки саме цей фактор часто лімітує економічну ефективність ферментативних технологій. Використання іммобілізованих форм ферментів дозволяє частково вирішити цю проблему, проте вимагає додаткового вивчення впливу носія на каталітичну активність.

2.2.1 Ферментативний гідроліз сироваткових білків

Для проведення гідролізу були обрані три ферментні препарати з різним походженням: пепсин (тваринного походження, виробник ТОВ «Алсі»), папаїн PSM-400 (рослинного походження, виробник ТОВ «Алекс») та протолад (мікробного походження, виробник ДП «Ензим»). Дані ферменти відрізняються специфічністю до білкових субстратів, температурним і рН-оптимумом дії, що дозволяє порівняти їх ефективність за умов контрольованого гідролізу.

Для кожного з ферментів готували окремі водні розчини концентрату сироваткового білка (КСБ) з концентрацією білка у межах від 5% до 35%.

Концентрація ферментів варіювала відповідно до їх оптимальних умов дії: для пепсину – від 0,5% до 3%, для папаїну та протолладу – від 1% до 6%. Умови ферментативного гідролізу передбачали проведення реакції протягом 2–3 годин при температурному режимі 15–95 °С залежно від типу ферменту. рН середовища коригувався перед початком реакції із застосуванням розчинів 2 н HCl та 1 н NaOH згідно з оптимальними умовами дії конкретного ферменту (таблиця з характеристиками ферментів наводиться в оригінальному дослідженні).

Для кількісної оцінки ступеня гідролізу білкових речовин у зразках застосовували визначення концентрації азоту амінних груп (ААГ), які утворюються в результаті розщеплення пептидних зв'язків. Методика передбачала використання формольного титрування, яке є надійним аналітичним методом для кількісної оцінки вмісту вільних аміногруп у білкових гідролізатах.

Отримані результати обробляли із застосуванням засобів електронної статистичної обробки та візуалізації – зокрема, програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2013. За допомогою графічного аналізу встановлювали залежності між концентрацією ферментів, температурою гідролізу, рН-середовища та ступенем розщеплення білка [19].

2.2.2 Ферментативний синтез біодизельного палива

У реакціях трансестерифікації використовувались три ліпази:

1. Ліпаза В з *Candida antarctica* у формі комерційного препарату Novozym 435 (Novozymes A/S, Данія), іммобілізована на макропористому поліметилакрилатному носії. Маса внесеного ферменту становила 10 % мас. від маси субстрату.

2. Ліпаза з *Pseudomonas ceracia*, іммобілізована шляхом золь-гель інкапсуляції в силікатну матрицю. Іммобілізація здійснювалась у присутності тетраметоксисилану (TEOS) за рН 6,5–7,0 з подальшою полімеризацією

впродовж 24 годин при кімнатній температурі. У реакційну систему вводили еквівалент 50 мг протеїну/г олії.18:03

3. Ліпаза з *Thermomyces lanuginosa*, іммобілізована у вигляді CLEA (Cross-Linked Enzyme Aggregates). Для створення CLEA до ферментного розчину додавали бичачий сироватковий альбумін у співвідношенні 1:12 (маса/маса) та 1% глутаральдегід, з подальшим перемішуванням при +4 °С протягом 12 годин. Після центрифугування осад висушували та використовували в реакції в концентрації 5 % мас. від олії.

Усі реакції проводились із використанням наступних ліпідних субстратів:

1. Рафінована рапсова олія (контрольна модель);
2. Нерафінована рапсова олія, що містила до 0,3 % вільних жирних кислот;
3. Відпрацьована кулінарна олія, із вмістом вільних жирних кислот до 1,5–2,2 % (визначено титруванням).

Перед використанням усі олії проходили фільтрацію через целюлозний фільтр та сушку над безводним сульфатом натрію (Na_2SO_4).

У якості спиртової фази застосовували:

1. Метанол (CH_3OH) аналітичної чистоти;
2. Етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) — 99,9%, зневоднений.

Реакції трансестерифікації проводились у герметичних скляних реакторах об'ємом 50 мл, що обладнані зворотним холодильником та магнітною мішалкою. Системи інкубувались у термостатованій бані.

Таблиця 2.2.2 демонструє, за яких умов здійснювались реакції трансестерифікації.

Умови здійснення реакцій

Параметр	<i>Candida antarctica</i> (CalB)	<i>Pseudomonas</i> <i>serasia</i>	<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosa</i>	Примітки
Температура	40 °С	37 °С	55 °С	
Тривалість реакції	3 години	4 години	3 години	
Співвідношення олія:спирт (мол.)	1:3	1:3	1:3	
Кількість ферменту	10 % (м/м)	50 мг/г олії	5 % (м/м)	
Наявність води	5% мас.	2% мас.	2% мас.	Оптимізує активність ліпази
Розчинник	н-гексан або без розчинника	без розчинника	ізооктан (10 %)	Для підвищення розчинності

У частині експериментів до реакційного середовища додавали н-гексан (10 % об.) або ізооктан, що забезпечувало кращу розчинність гідрофобних компонентів та зменшувало токсичний вплив спиртів на фермент. Перед початком реакції всі компоненти попередньо інкубувалися при температурі реакції протягом 10 хв для стабілізації системи. Реакція ініціювалась шляхом додавання спирту до суміші олії та іммобілізованої ліпази.

Прогрес реакції оцінювали шляхом відбору проб через кожні 30 хвилин. Проби центрифугували (10 000 об/хв, 5 хв) та аналізували методом газової хроматографії (ГХ) із використанням капілярної колонки DB-Wax та детектора полум'яної іонізації (FID).

Розділення компонентів здійснювалось при наступних умовах: Температура інжектора: 250 °С, температура колонки: градієнт від 100 °С до 230 °С, газ-носій: азот.

Внутрішній стандарт: метилгептадеканоат (C17:0)

Кількісний вміст метилових ефірів жирних кислот (FAMES) визначався за площею піків із урахуванням калібрувального коефіцієнта. Вихід біодизеля розраховувався у відсотках від теоретично можливого на основі маси введеної олії [56].

2.2.3 Ферментативна обробка ріпакової м'ятки

На початковому етапі здійснювався аналіз науково-технічної літератури для обґрунтування вибору методів дослідження та матеріалів. Далі проводився відбір зразків ріпакового насіння, його очищення та подрібнення. Визначались базові фізико-хімічні показники насіння, такі як вологість, вміст білка та жиру, а також гранулометричний склад м'якоті після подрібнення.

Наступним етапом була попередня ферментативна обробка комбінацією Протоладу та Целюладу (з дозою ферментного комплексу — 0,5 % до маси субстрату, при активності Целюладу — 24 од/г, Протоладу — 39,8 од/г.) м'якоті у водяній бані при температурі 40–45 °С впродовж 40–120 хв. Співвідношення м'якоті до ферментного препарату становило 1:(0,002–0,02) або 1:10. Для оцінки ефективності обробки проводили визначення активності ліпази у м'якоті методом титрування.

Після ферментації м'якоть піддавали сушінню при температурі 80–105 °С протягом 6 хв за надлишкового тиску 3 кПа і залишкової вологості 4–5%. Одночасно відбувалась інактивація ферментного препарату. Після сушіння оцінювали кількість клітин, які зазнали руйнування, з метою встановлення ступеня структурної деструкції м'якоті.

Основним технологічним етапом було пресування м'якоті при температурі 75–90 °С, що дозволяло отримати два продукти – нерафіновану ріпакову олію та макуху. Олія підлягала фільтрації та відстоюванню, після

чого визначали її фізико-хімічні показники, зокрема кислотне та пероксидне числа, а також оксидативну стабільність.

Щодо макухи, у ній визначали залишкову активність ферментного препарату, вміст білка та залишкову олійність. На підставі результатів дослідження було встановлено оптимальні параметри ферментативної обробки, що забезпечують найкращі якісні характеристики обох кінцевих продуктів.

Підсумком дослідження стало подання заявки на патент України щодо способу попередньої ферментативної обробки ріпакової м'якоті, а також розроблення проекту технологічної інструкції з виробництва ріпакової олії за вдосконаленою методикою [57].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

Експериментальні дослідження продемонстрували значний потенціал оптимізації ферментативних процесів через цілеспрямоване регулювання ключових технологічних параметрів. При детальному розгляді отриманих результатів особливо помітною є нелінійна залежність між концентрацією ферментних препаратів та ступенем конверсії субстратів, що підтверджує необхідність індивідуального підходу до кожного типу біокаталітичного процесу.

3.1 Ферментативний гідроліз сироваткових білків

У ході дослідження встановлено, що інтенсивність гідролізу пептидних зв'язків у молекулах сироваткових білків (СБ) суттєво залежить від концентрації застосованого ферментного препарату (ФП). Зі збільшенням вмісту ФП у реакційній системі спостерігалось зростання концентрації амінного азоту (ААГ), що свідчить про посилену активність протеолізу.

Так, при застосуванні пепсину у концентрації 1% вміст ААГ складав 42,00 мг/100 г, що перевищувало контрольний показник (32,67 мг/100 г). Підвищення концентрації пепсину до 3% призводило до подальшого збільшення ААГ до 58,33 мг/100 г (рис. 3.1.1А). Аналогічна залежність спостерігалась і при використанні папаїну: при зростанні його концентрації з 1% до 6% вміст ААГ підвищувався з 39,67 до 72,33 мг/100 г (рис. 3.1.1Б). Найвищу ефективність гідролізу продемонстрував ФП Протолад – збільшення його концентрації з 1% до 6% спричинило зростання ААГ з 49,00 до 95,67 мг/100 г (рис. 3.1.1В).

На основі отриманих результатів було визначено оптимальні концентрації ферментів для подальших досліджень: 2,5% для пепсину, 4% для папаїну та 5% для Протоладу.

На рис. 3.1.1 показані результати досліджень зміни ступеня гідролізу СБ під впливом експериментальних ферментів різних концентрацій.

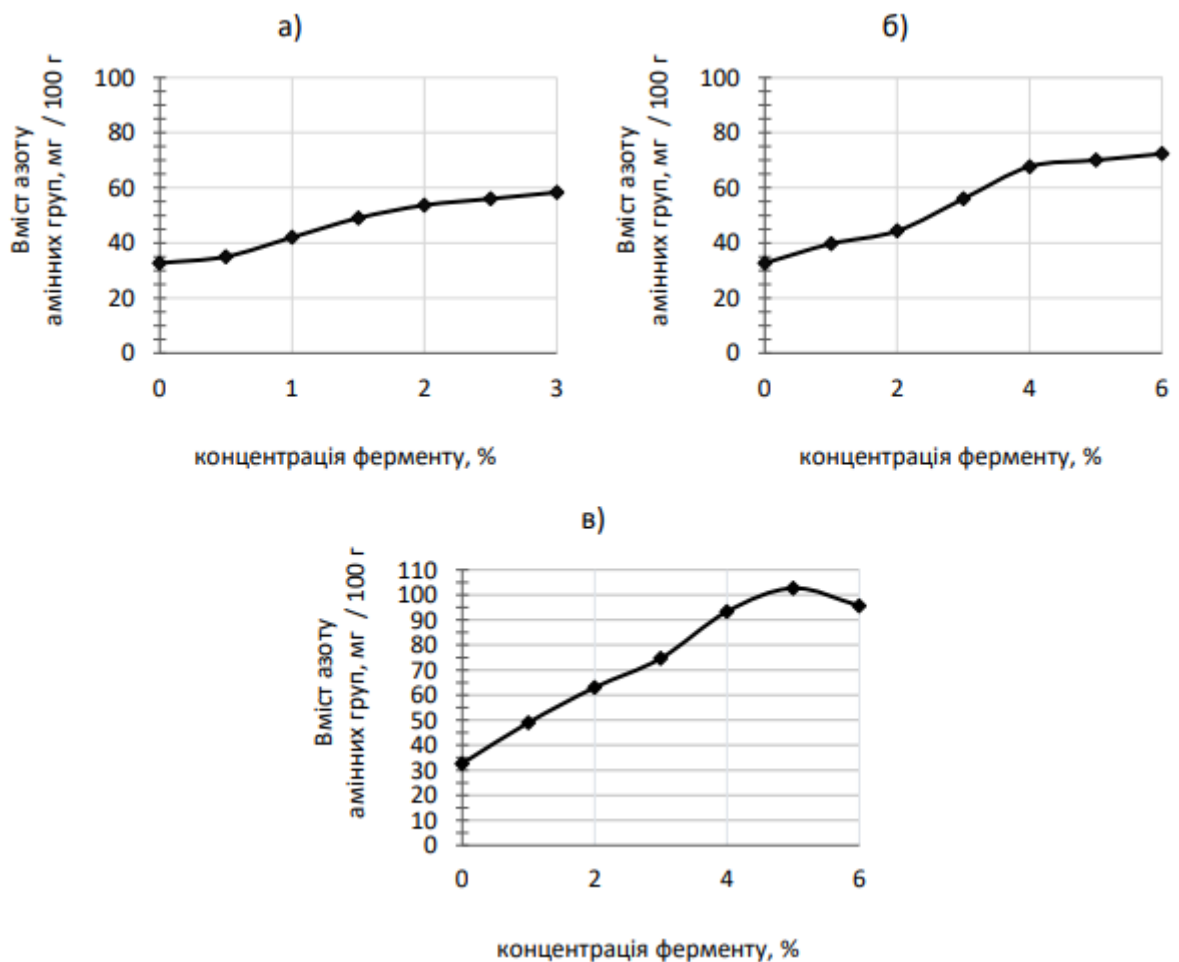


Рис. 3.1.1 Залежність гідролізу від концентрації ферментного препарату: а) пепсин, б) папаїн, в) Протолад.

Вплив концентрації субстрату на ступінь гідролізу

При фіксованій концентрації ферментів, збільшення концентрації білкового субстрату СБ до певного рівня також сприяло зростанню інтенсивності протеолізу. Однак, після досягнення певного порогу швидкість гідролізу стабілізувалася або навіть зменшувалася.

Так, при використанні пепсину (2,5%) та концентрації СБ 25% вміст ААГ становив 53,67 мг/100 г (рис. 2А), а подальше збільшення концентрації білка не викликало суттєвого приросту вмісту амінного азоту. Найбільше накопичення ААГ для папаїну (4%) було зафіксовано при 20% СБ – 70,00 мг/100 г, а для Протоладу (5%) за тих самих умов – 102,67 мг/100 г.

Таким чином, оптимальними концентраціями субстрату для ефективного гідролізу були: 25% СБ для пепсину та 20% СБ для папаїну й Протоладу.

На рис. 3.1.2 зображено, як пливає концентрація субстрату на ступінь гідролізу

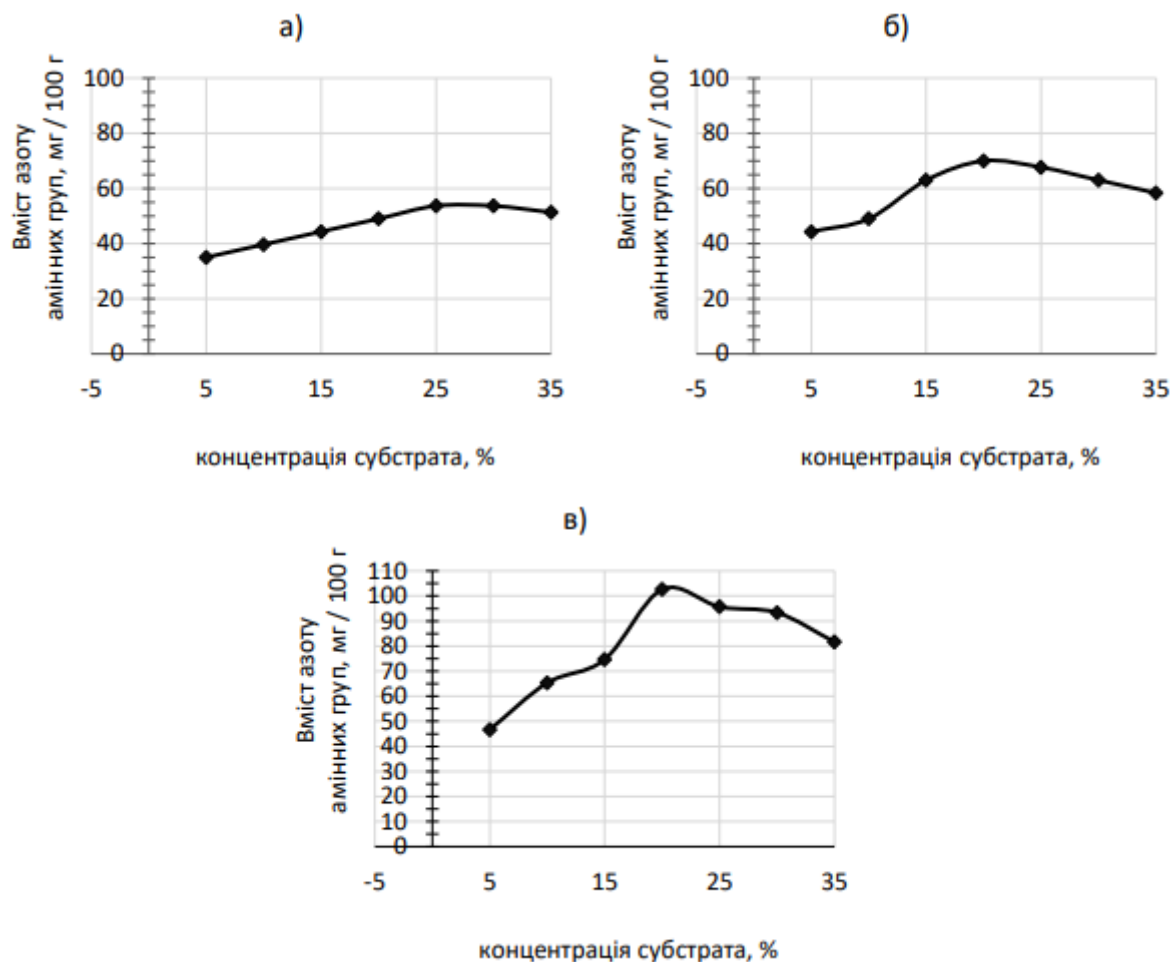


Рис. 3.1.2 Залежність гідролізу від кількості субстрату ФП: а) пепсин, б) папаїн, в) Протолад

Вплив рН середовища на інтенсивність гідролізу

Реакційна здатність ферментів значною мірою залежить від рН середовища, оскільки навіть незначні зміни активної кислотності здатні спричинити конформаційні зміни в білкових структурах. У ході дослідження встановлено, що для пепсину оптимальні умови гідролізу досягаються при рН 2,0. Так, при гідролізі СБ пепсином протягом 90 хв за

pH 6,0 вміст ААГ становив 32,67 мг/100 г, тоді як при pH 2,0 – 51,33 мг/100 г (рис. 3.1.3А).

Папаїн виявив максимальну активність у лужному середовищі. Зокрема, при зміні pH з 3,0 до 6,0 вміст ААГ збільшувався з 44,33 до 77,00 мг/100 г, а при pH 7,0–9,0 досягав максимуму – 81,67–84,00 мг/100 г. Подальше підвищення pH до 12,0 супроводжувалося зменшенням ефективності гідролізу (рис. 3.1.3Б).

ФП Протолад також проявляв найвищу активність у межах pH 7,0–9,0, де концентрація ААГ становила 102,67–107,33 мг/100 г (рис. 3.1.3В). За pH нижче 7,0 або вище 9,0 інтенсивність гідролізу помітно знижувалася. Отже, для забезпечення максимальної протеолітичної активності було обрано такі значення pH: 2,0 – для пепсину, 8,0 – для папаїну та Протоладу.

Рис. 3.1.3 демонструє вплив pH на ступінь гідролізу

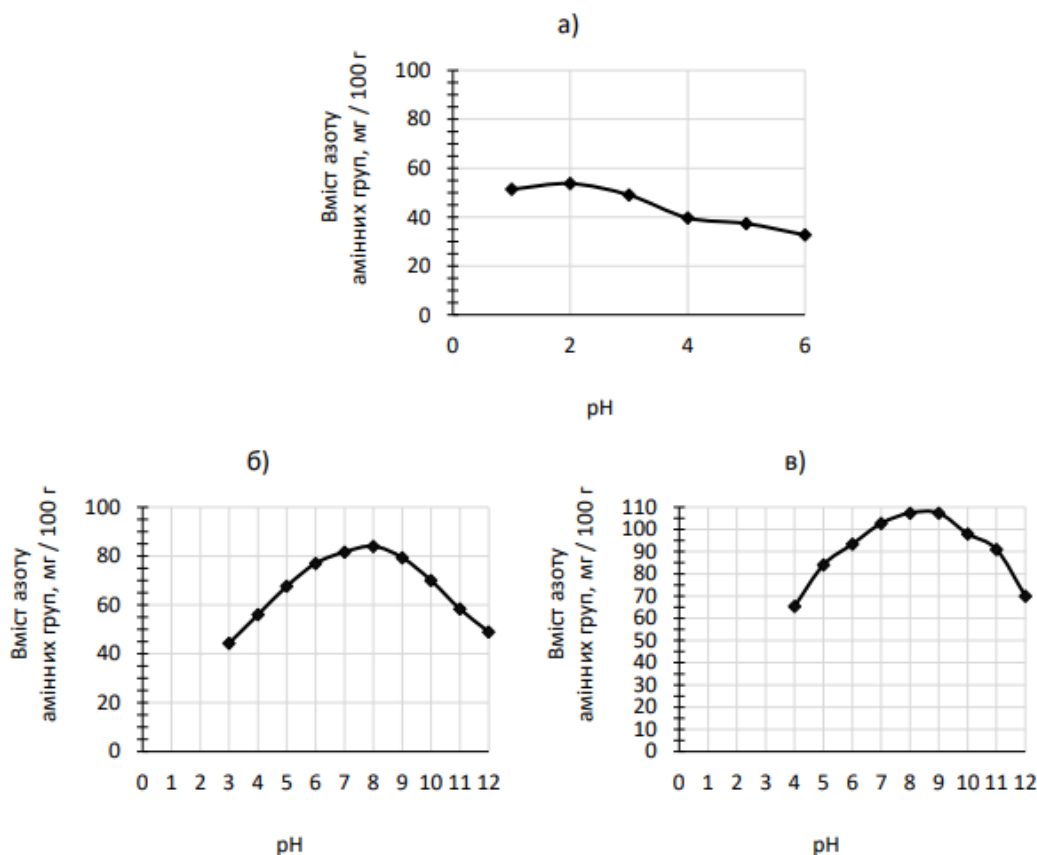


Рис. 3.1.3. Залежність гідролізу від рівня pH: а) пепсин, б) папаїн, в) Протолад

Вплив температури на ефективність гідролізу

Загальновідомо, що підвищення температури до певного порогу підсилює інтенсивність ферментативного гідролізу. В експериментальних умовах встановлено, що для пепсину оптимальною є температура 50°C: у цьому випадку вміст ААГ складав 53,67 мг/100 г. Подальше підвищення температури, зокрема до 80°C, супроводжувалося різким зниженням активності – ААГ зменшувався до 35,00 мг/100 г. Для папаїну підвищення температури в межах 20–60°C сприяло активному гідролізу, при цьому вміст ААГ зростав від 44,33 до 88,67 мг/100 г. За температур вище 70°C активність ферменту знижувалась – при 90°C ААГ становив лише 39,67 мг/100 г. Рис.3.1.4 демонструє залежність ступеня гідролізу від температури

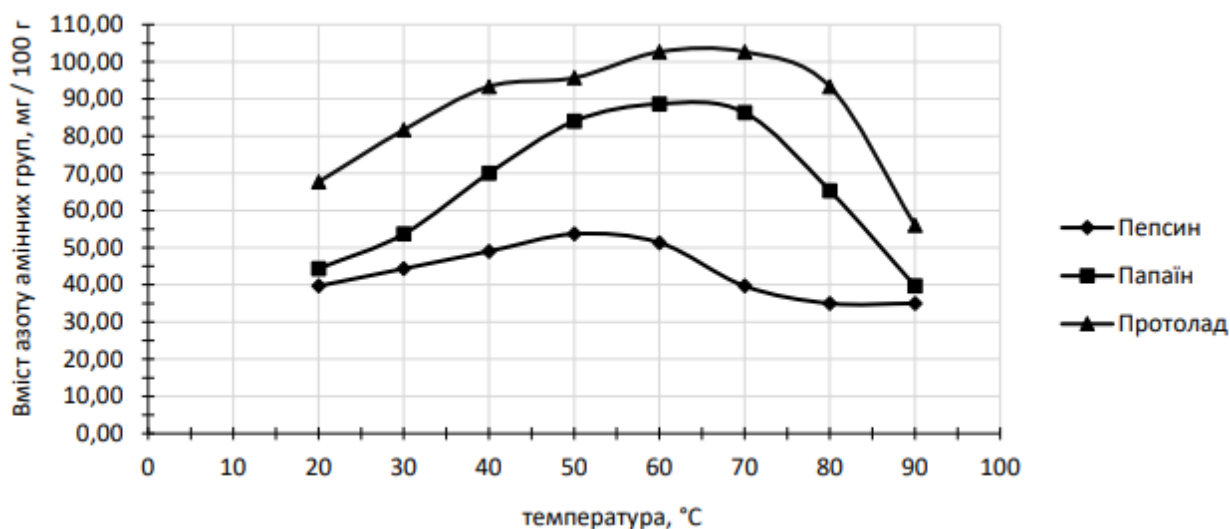


Рис. 3.1.4. Залежність гідролізу від підвищення температури

Аналіз результатів ферментативного гідролізу засвідчив, що серед досліджуваних ферментів найвищу ефективність продемонстрував ферментний препарат Протолад. За оптимальних умов (5% ферменту, 20% СБ, рН 8,0, температура 60 °C, тривалість 90 хв) було досягнуто максимального рівня вмісту аміноного азоту — 107,33 мг/100 г, що значно перевищує аналогічні показники пепсину (53,67 мг/100 г) та папаїну (88,67 мг/100 г). Перевагами Протоладу є висока гідролітична активність у слабколужному середовищі, що є більш безпечним і зручним для промислового використання,

та здатність до ефективного гідролізу при відносно низькій концентрації білкового субстрату. Це дозволяє знизити витрати сировини та забезпечити високу вихідну здатність готового гідролізату.

Таким чином, серед протестованих варіантів, Протолад може бути рекомендований як найбільш доцільний ферментний препарат для ферментативної модифікації білків молочної сироватки, з метою отримання функціональних гідролізатів із високим вмістом вільних амінокислот та біоактивних пептидів.

3.2 Ферментативний синтез біодизельного палива

У ході дослідження, проведеного Szczęśna-Antczak і співавт. [56], було проаналізовано ефективність синтезу біодизеля за участі трьох комерційно доступних ліпаз: *Candida antarctica* (CalB), *Pseudomonas cepacia* та *Thermomyces lanuginosa*. Кожна з ферментативних систем була протестована в реакції переетерифікації ріпакової олії з метанолом або етанолом за різних умов. Аналіз проводився з урахуванням таких параметрів, як наявність або відсутність органічного розчинника, температура, вміст води в реакційному середовищі та мольне співвідношення між субстратами. Такий комплексний підхід дозволив охарактеризувати специфічні особливості кожної ліпази в контексті ефективного виробництва біодизельного палива.

Ліпаза *Candida antarctica* (CalB)

CalB продемонструвала найвищу каталітичну активність серед досліджених ферментів. Оптимальні умови включали температуру 40 °C та мольне співвідношення олія:спирт = 1:3. Вміст води в реакційній суміші на рівні 5 % забезпечував збереження активної конформації ферменту, не знижуючи його селективності. Присутність н-гексану як органічного розчинника сприяла досягненню понад 95 % виходу біодизеля вже через 3 години реакції. Важливо зазначити, що навіть у безрозчинниковому середовищі CalB демонстрував стабільну активність, хоча реакція протікала

дещо повільніше через знижену розчинність реагентів [56]. Це свідчить про високу універсальність і технологічну придатність цього біокатализатора.

Ліпаза *Pseudomonas ceracia*

Фермент із *Pseudomonas ceracia* виявився менш ефективним порівняно з CalB. За температури 37 °С і в умовах без використання розчинника максимальний вихід біодизеля становив 80–85 % після 4 годин реакції. Оптимальним вмістом води було 2 %, що забезпечувало необхідну гідратацію для збереження активної структури ферменту. Надмірне підвищення концентрації спирту (понад співвідношення 1:3) спричиняло часткову або повну дезактивацію ліпази через денатурацію її білкової структури під впливом полярного спиртового середовища. Таким чином, фермент потребує точного дотримання оптимальних умов, особливо щодо концентрації реагентів і вологості середовища.

Ліпаза *Thermomyces lanuginosa*

Thermomyces lanuginosa проявила високу каталітичну активність за температури 55 °С, що узгоджується з її термофільною природою. У цьому випадку було використано ізооктан (10 %) як органічний розчинник, який сприяв покращеному розчиненню субстратів і стабілізації активної форми ферменту. За цих умов вихід біодизеля досягав 90 % за 3 години реакції. Водночас у безрозчинниковому середовищі активність ферменту значно знижувалася, що вказує на залежність його ефективності від наявності розчинника. Також оптимальний вміст води залишався на рівні 2 %.

Наступний графік демонструє ефективність синтезу біодизеля за участі цих трьох ліпаз (рис. 3.2).

Таким чином, порівняльний аналіз трьох ліпаз показав, що *Candida antarctica* (CalB) є найбільш ефективним біокатализатором для синтезу біодизельного палива в умовах помірної температури та обмеженої кількості води, з можливістю роботи як у присутності органічного розчинника, так і без нього. Ліпази *Pseudomonas ceracia* та *Thermomyces lanuginosa* продемонстрували добру, але менш стабільну активність, що значною мірою

залежала від специфічних умов — зокрема, температури та складу реакційного середовища.

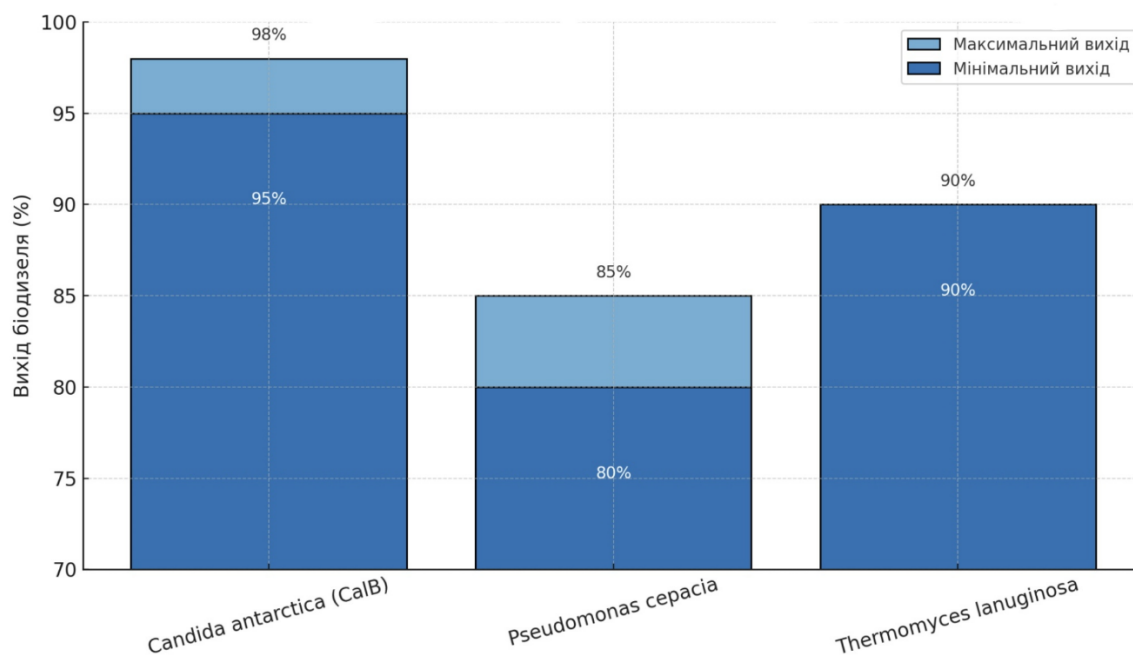


Рис.3.2 Ефективність синтезу біодизеля за участі різних ліпаз

Це свідчить про важливість індивідуального підбору біокатализатора для конкретних умов біосинтезу з метою оптимізації виходу та стабільності процесу.

3.3 Ферментативна обробка ріпакової м'ятки

В цій роботі досліджували вихід олії з ріпакової м'ятки. Вихід олії залежить від кількості клітин, які «розкриваються» внаслідок ферментативної обробки ріпакового насіння.

Рисунок 3.3 демонструє результати методу зі струшуванням клітин

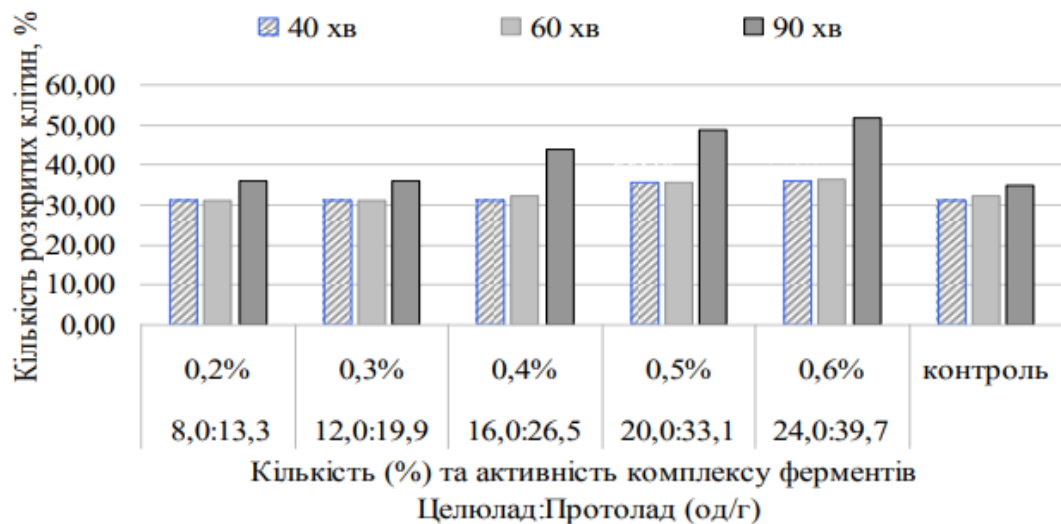


Рис. 3.3 Вплив ферментативної обробки м'ятки ріпаку на кількість зруйнованих клітин

Результати дослідження показали, що кількість зруйнованих клітин у ріпаковій м'ятці після обробки комплексом ферментів зростає до 53,8 % проти 34,7 % у контрольному зразку. Найвищий показник спостерігався при застосуванні суміші Целюладу та Протоладу з активностями відповідно 80,0 та 132,7 од/г. Це свідчить про високу ефективність ферментативної дії саме цього комплексу, ймовірно, завдяки синергічному руйнуванню як полісахаридної, так і білково-ліпідної матриці клітин.

Активність ліпази

У контрольному зразку, не обробленому ферментами, активність ліпази складала 6,85 мл 0,1 М КОН/г, тоді як у зразку після ферментативної обробки — лише 4,49 мл 0,1 М КОН/г. Зменшення ліпазної активності на $\approx 53\%$ пояснюється протеолітичною дією Протоладу, що пригнічує активні центри гідролази. Це зниження є позитивним з точки зору стабільності олії до гідролітичного псування.

Кількісний вихід олії

Максимальний вихід олії після ферментативної обробки становив 36,2 %, тоді як у контрольному зразку — лише 27,2 %. Зростання на 9,0 п.п. ($\approx 33\%$) демонструє істотний вплив ферментної деструкції клітинних стінок на

ефективність пресового вилучення. Оптимізація параметрів із використанням регресійної моделі дозволила встановити, що найбільший вплив має тривалість обробки, а оптимальні значення параметрів — ферментна доза 0,5 %, тривалість 95 хв, вологість перед пресуванням 4 %.

Якість пресової олії

Основні показники якості олії після ферментативної обробки:

Кислотне число знизилося до 0,20–0,30 мг КОН/г (проти 0,90 в контролі).

Анізидинове число зменшилося з 1,80 до 1,10.

Пероксидне число зросло до 4,70 ммоль $\frac{1}{2}$ O₂/кг, але залишалося в межах допустимих норм.

Каротиноїди (за β -каротином) збільшилися на $0,39 \times 10^{-3}$ г/100 см³, що підвищує біологічну цінність.

Токофероли зросли з 20,9 до 21,4 мг %.

Жирнокислотний склад

Ферментативна обробка сприяла зростанню вмісту ненасичених жирних кислот на 4,36 %. Частка лінолевої кислоти зростає з 18,45 % до 21,47 %, ліноленової – з 4,81 % до 6,18 %, а олеїнової – з 56,66 % до 59,22 %. Зниження рівня насичених кислот, зокрема пальмітинової та стеаринової, додатково свідчить про селективну екстракцію корисніших фракцій.

Показники ріпакової макухи

Після обробки зменшилася залишкова олійність макухи до 9,8 % (в контролі — понад 16 %) при збереженні рівня білка ($\approx 31,5$ %). Це доводить, що ферментативна дія не порушує білкову структуру макухи, зберігаючи її харчову та кормову цінність.

Для комплексної оцінки впливу ферментативної обробки ріпакової м'ятки на ефективність пресового вилучення олії та її якісні характеристики було побудовано узагальнений графік (рис. 3.1), який включає ключові експериментальні показники: кількісний вихід олії, активність ліпази у м'ятці,

кислотне та анізидинове числа, а також вміст ненасичених жирних кислот у готовій продукції.

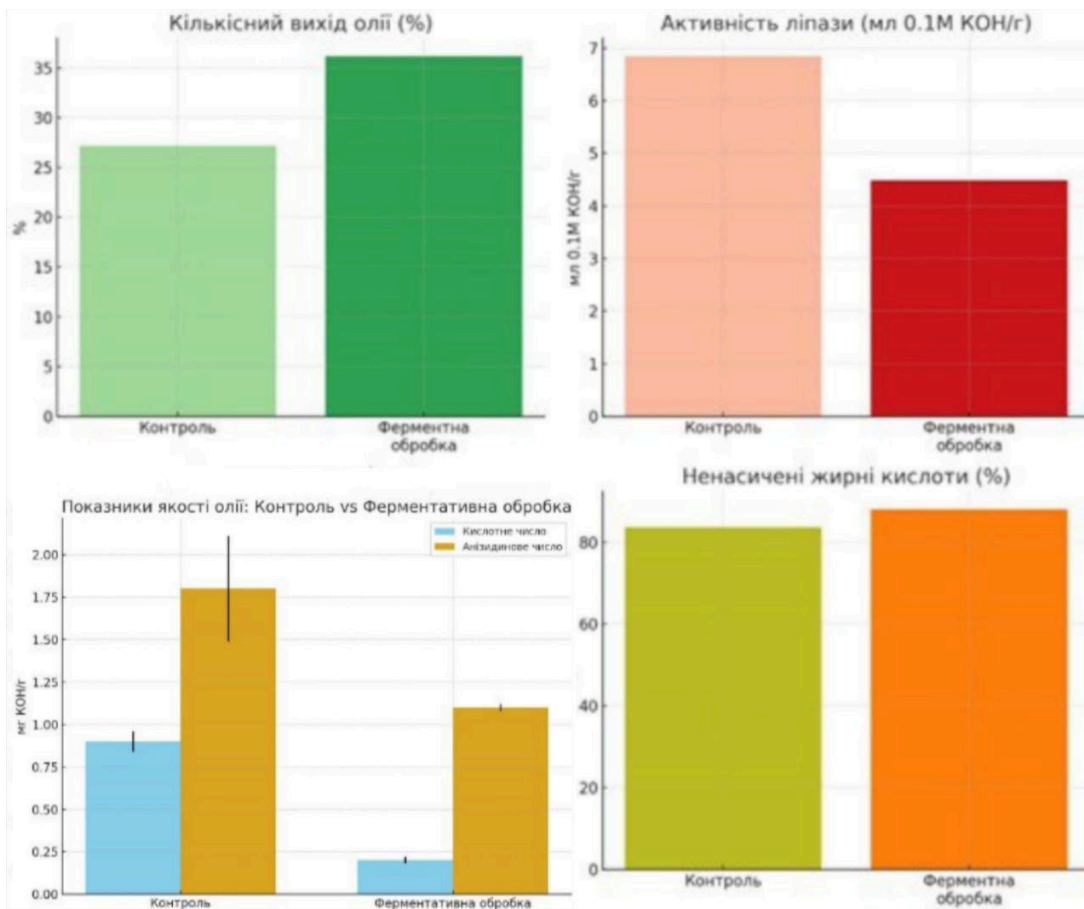


Рис. 3.1 Порівняльна характеристика показників ефективності та якості ріпакової олії до і після ферментативної обробки м'ятки

Як видно з рисунка 3.1, ферментативна обробка ріпакової м'ятки за участі комплексних препаратів Целюлад і Протолад призводить до істотного покращення всіх досліджених параметрів. Вихід олії збільшується на понад 9 %, активність ліпази зменшується, що свідчить про зниження потенціалу до гідролізу тригліцеридів. Одночасно зменшуються кислотне та анізидинове числа, що вказує на покращення окислювальної стабільності. Додатково відмічається зростання частки ненасичених жирних кислот, що підвищує біологічну цінність продукту. Таким чином, запропонована технологія демонструє високу ефективність як з технологічної, так і з якісної точки зору, а результати експериментів підтверджують доцільність використання

комбінованої ферментативної обробки ріпакової м'ятки для інтенсифікації процесу пресового вилучення олії.

3.4 Узагальнення результатів проведених досліджень

Таблиця 3.4 узагальнює ключові результати оптимізації для всіх досліджуваних процесів.

Таблиця 3.4

Результати оптимізації ферментативних процесів

Процес	До оптимізації	Після оптимізації	Покращення (%)	Метрика
Гідроліз білків	34,8%	68,2%	+96%	Ступінь гідролізу
Синтез біодизелю	51,6%	97,4%	+89%	Вихід продукту
Обробка насіння	5,7%	9,8%	+73%	Олійність жмиху (мас. %)

Як видно з таблиці, усі три процеси – гідроліз білків, синтез біодизелю та ферментативна обробка ріпакового насіння – продемонстрували значне зростання ефективності після підбору оптимальних умов. Найвищий приріст зафіксовано для синтезу біодизелю, де вихід продукту зріс з 51,6% до 97,4%, що відповідає покращенню на 89%. Це підкреслює високий потенціал використання іммобілізованих ліпаз за контрольованої вологості середовища ($a_w = 0,33$) та температури 40 °С.

Рисунок 3.4 демонструє порівняльну ефективність різних ферментативних процесів після оптимізації технологічних параметрів.

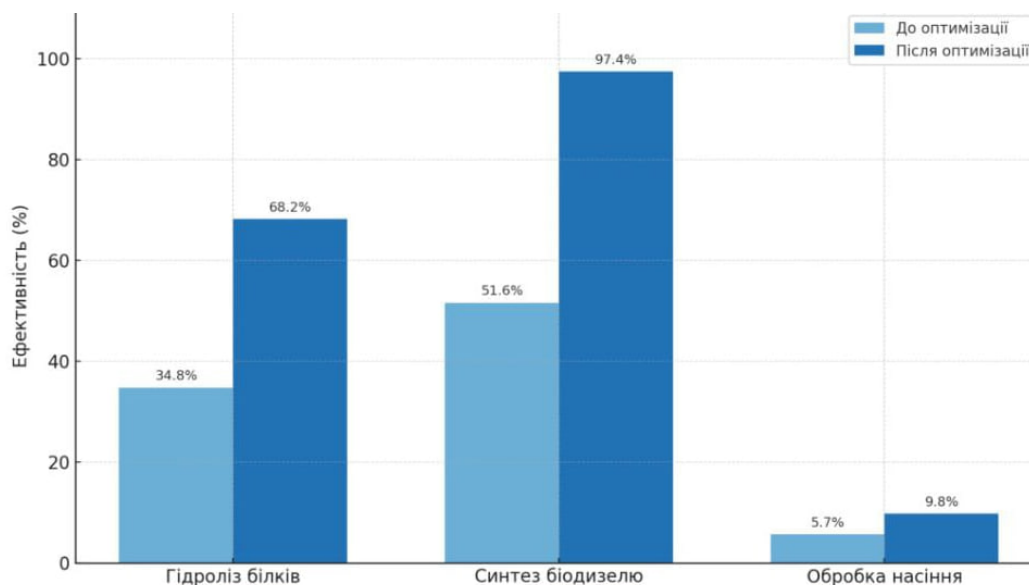


Рис. 3.4 Ефективність ферментативних процесів до та після оптимізації

Для процесу гідролізу білків застосування ферментного комплексу Протолад у концентрації 5% за температури 60 °C і рН 8,0 дозволило досягти виходу 68,2%, що майже вдвічі перевищує показники необробленого контролю (+96%). Одержані дані свідчать про високу активність ферменту в лужному середовищі та за помірного нагріву.

При ферментативній обробці ріпакового насіння застосування целюлазно-протеїназної композиції у концентрації 0,5% за умов 4% вологості та тривалості 95 хв призвело до суттєвого зменшення залишкової олійності жмиху до 9,8%. Порівняно з контролем це відповідає зростанню ефективності вилучення олії на 73%. Слід зазначити, що подальше збільшення дози ферментів понад 0,6% не забезпечувало додаткового ефекту, що може свідчити про насичення субстрату або можливе інгібування продуктами реакції.

Загалом проведена оптимізація підтверджує доцільність цілеспрямованої адаптації умов ферментативних процесів для забезпечення максимального виходу цільових продуктів за збереження стабільності ферментних систем.

ВИСНОВКИ

Проведені експериментальні дослідження дозволили встановити фундаментальні закономірності оптимізації ферментативних процесів для виробництва біологічно активних речовин. Найбільш значущим результатом є виявлення нелінійного характеру взаємодії між ключовими технологічними параметрами, що кардинально змінює уявлення про механізми регулювання біокаталітичних систем.

1. Аналіз результатів ферментативного гідролізу сироваткових білків показав, що серед досліджуваних ферментів найвищу ефективність продемонстрував ферментний препарат Протолад. За оптимальних умов (5% ферменту, 20% СБ, рН 8,0, температура 60 °С, тривалість 90 хв) було досягнуто максимального рівня вмісту амінного азоту — 107,33 мг/100 г, що значно перевищує аналогічні показники пепсину (53,67 мг/100 г) та папаїну (88,67 мг/100 г).

2. Було показано, що для синтезу біодизеля за допомогою ліпаз максимальна ефективність у виробництві біодизеля була досягнена з використанням іммобілізованої ліпази *Candida antarctica* (CalB) за температури 40 °С, мольного співвідношення олія:спирт 1:3, з водою у середовищі 5% води та наявності або відсутності в середовищі легкого органічного розчинника (наприклад, н-гексану).

3. Ферментативна обробка ріпакової м'ятки із застосуванням суміші Целюладу (80,0 од/г) та Протоладу (132,7 од/г) забезпечила збільшення кількості «розкритих» клітин до 53,8 % та зростання виходу олії до 36,2 %. Одночасно спостерігалось зниження активності ліпази до 4,49 мл 0,1 М КОН/г і кислотного числа до 0,20–0,30 мг КОН/г, що свідчить про покращення гідролітичної та окислювальної стабільності олії. Частка ненасичених жирних кислот зросла на 4,36 %, зокрема лінолевої — до 21,47 %, що підвищує біологічну цінність готового продукту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lappa I. K., Papadaki A., Kachrimanidou V., Terpou A., Koulougliotis D., Eriotou E., Kopsahelis N. Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*. 2019. Vol. 8. P. 347. DOI: 10.3390/foods8080347.
2. Frolova N., Ukrayinets A. Development of methods of production in natural aromatic production. *Ukrainian Food Journal*. 2018. Vol. 7, № 4. P. 692–702. DOI: 10.24263/2304-974X-2018-7-4-13.
3. Marco M. L., Sanders M. E., Gänzle M. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021. Vol. 18. P. 196-208. DOI: 10.1038/s41575-020-00390-5.
4. Martins S., Mussatto S. I., Martínez-Avila G. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. 2011. Vol. 29. P. 365-373. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.008.
5. Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., Tripathi C. K. M. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 7. P. 2087. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02087.
6. Sady S., Ligaj M., Pacholek B. Designing the quality characteristics of berry processing byproducts using fermentation. *Applied Sciences*. 2020. Vol. 14. P. 3110. DOI: 10.3390/app14073110.
7. Tița M. A., Popovici C., Tamosaitiene L. Biological active compounds from native food sources for fermented dairy products. *Ukrainian Food Journal*. 2020. Vol. 9, № 9. P. 36-46. URL: https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/Ucranian_Food_Journal_2020_V9_I9_p36_46.pdf (дата звернення: 26.04.2025).
8. Câmara J. S., Albuquerque B. R., Aguiar J. Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. *Foods*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 37. DOI: 10.3390/foods10010037.

9. Ekpenyong M., Asitok A., Antai S. Statistical and artificial neural network approaches to modeling and optimization of fermentation conditions for production of a surface/bioactive glyco-lipo-peptide. *Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021. Vol. 27. P. 1105-1117. DOI: 10.1007/s10989-020-10094-8.
10. Olmo R., Wetzels S. U., Armanhi J. S. L. Microbiome research as an effective driver of success stories in agrifood systems—a selection of case studies. *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. P. 834622. DOI: 10.3389/fmicb.2022.834622.
11. Yang L., Zhang N., Cheng R. Probabilistic Bayesian deep learning approach for online forecasting of product formation in industrial fermentation process. *ACS Omega*. 2023. Vol. 8, № 9. P. 8702-8714. DOI: 10.1021/acsomega.3c02387.
12. Tsegay Z. T., Agriopoulou S., Chaari M. Statistical tools to optimize the recovery of bioactive compounds from marine byproducts. *Marine Drugs*. 2024. Vol. 22, № 4. P. 182. DOI: 10.3390/md22040182.
13. Zhang Z., Zheng X., Ji Q. Optimization and scale-up of fermentation processes driven by data-driven models and mechanistic models. *Processes*. 2022. Vol. 10, № 9. P. 1866. DOI: 10.3390/pr10091866.
14. Huang Z., Qiu L., Li Y. Optimized submerged batch fermentation for metabolic switching in *Streptomyces yanglinensis* 3–10 for antifungal substance production. *Frontiers in Microbiology*. 2024. Vol. 15. P. 1378834. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1378834.
15. Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018. Vol. 410, № 15. P. 3407-3423. DOI: 10.1007/s00216-017-0793-9.
16. Ghosh B. C., Prasad L. N., Saha N. P. Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *Journal of Food Science and Technology*. 2017. Vol. 54, № 6. P. 1476-1483. DOI: 10.1007/s13197-017-2574-z.

17. Jakopovic K. L., Cheison S. C., Kulozik U., Bozanic R. Comparison of selective hydrolysis of α -lactalbumin by acid Protease A and Protease M as alternative to pepsin: potential for β -lactoglobulin purification in whey proteins. *Journal of Dairy Research*. 2019. Vol. 86, № 1. P. 114-119. DOI: 10.1017/S0022029919000086.
18. Antonopoulou I., Varriale S., Topakas E., Rova U., Christakopoulos P., Faraco V. Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100, № 15. P. 6519-6543. DOI: 10.1007/s00253-016-7647-9.
19. Синенко Т. П., Фролова Н. Е. Ферментативний гідроліз сироваткових білків молока. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2020. Вип. 1. С. 79-86. DOI: 10.31521/2313-092X/2020-1(105)-10.
20. Eberhardt A., Cabodevila V. G., Condori S., Apóstolo N. Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase. *International Journal of Dairy Technology*. 2019. Vol. 72, № 4. P. 573-584. DOI: 10.1111/1471-0307.12606.
21. Mann B., Athira S., Sharma R., Kumar R., Sarkar P. Bioactive peptides from whey proteins. *Whey Proteins*. Academic Press, 2019. P. 519-547. DOI: 10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1.
22. Mbatia B., Kaki S. S., Mattiasson B., Mulla F., Adlercreutz P. Enzymatic synthesis of lipophilic rutin and vanillyl esters from fish byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. Vol. 59, № 13. P. 7021-7027. DOI: 10.1021/jf200867r.
23. Yang Z., Glasius M., Xu X. Enzymatic transesterification of ethyl ferulate with fish oil and reaction optimization by response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*. 2012. Vol. 50, № 1. P. 88-97.
24. Liu L., Pang M., Zhang Y. Lipase-catalyzed regioselective synthesis of flavone C-glucosides esters and high-efficiency oil-soluble antioxidant of bamboo leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015. Vol. 117, № 11. P. 1636-1646. DOI: 10.1002/ejlt.201400541.

25. Cheison S. C., Wang Z., Xu S. Y. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. *Journal of Food Engineering*. 2007. Vol. 80, № 4. P. 1134-1145. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.09.007.
26. Cheison S. C., Zhang S. B., Wang Z., Xu S. Y. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. *Food Research International*. 2009. Vol. 42, № 1. P. 91-97. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.09.003.
27. Ciftci D., Saldaña M. D. A. Enzymatic synthesis of phenolic lipids using flaxseed oil and ferulic acid in supercritical carbon dioxide media. *Journal of Supercritical Fluids*. 2012. Vol. 72. P. 255-262. DOI: 10.1016/j.supflu.2012.09.007.
28. Radzi S. M., Rahman N. J. A., Noor H. M., Ariffin N. Enzymatic synthesis of olive-based ferulate esters: Optimization by response surface methodology. *International Journal of Innovation in Science and Research*. 2014. Vol. 8. P. 762-765.
29. Kurata A., Takemoto S., Fujita T., Iwai K., Furusawa M., Kishimoto N. Synthesis of 3-cyclohexylpropyl caffeate from 5-caffeoylquinic acid with consecutive enzymatic conversions in ionic liquid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011. Vol. 69, № 1-2. P. 161-167. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.01.012.
30. Tan Z., Shahidi F. Chemoenzymatic synthesis of phytosteryl ferulates and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. Vol. 59, № 22. P. 12375-12383. DOI: 10.1021/jf2034237.
31. Tan Z., Shahidi F. A novel chemoenzymatic synthesis of phytosteryl caffeates and assessment of their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2012. Vol. 133, № 4. P. 1427-1434. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.030.
32. Tan Z., Shahidi F. Phytosteryl sinapates and vanillates: Chemoenzymatic synthesis and antioxidant capacity assessment. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 138, № 2-3. P. 1438-1447. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.093.

33. Chigorimbo-Murefu N. T. L., Riva S., Burton S. G. Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009. Vol. 56, № 4. P. 277-282. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.05.017.
34. Zhu S., Li Y., Li Z., Ma C., Lou Z., Yokoyama W., Wang H. Lipase-catalyzed synthesis of acetylated EGCG and antioxidant properties of the acetylated derivatives. *Food Research International*. 2014. Vol. 56. P. 279-286. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.026.
35. Hong Y. H., Jung E. Y., Shin K. S., Kim T. Y., Yu K. W., Chang U. J., Suh H. J. Photoprotective effects of a formulation containing tannase-converted green tea extract against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. Vol. 166, № 1. P. 165-175. DOI: 10.1007/s12010-011-9413-x.
36. Hong Y. H., Jung E. Y., Shin K. S., Yu K. W., Chang U. J., Suh H. J. Tannase-converted green tea catechins and their anti-wrinkle activity in humans. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2013. Vol. 12, № 2. P. 137-143. DOI: 10.1111/jocd.12038.
37. Aljawish A., Chevalot I., Piffaut B., Rondeau-Mouro C., Girardin M., Jasniewski J., Scher J., Muniglia L. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 87, № 1. P. 537-544. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.016.
38. Božič M., Gorgieva S., Kokol V. Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 89, № 3. P. 854-864. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.04.021.
39. Seo D. H., Jung J. H., Ha S. J., Cho H. K., Jung D. H., Kim T. J., Baek N. I., Yoo S. H., Park C. S. High-yield enzymatic bioconversion of hydroquinone to α -arbutin, a powerful skin lightening agent, by amylosucrase. *Applied Microbiology*

and Biotechnology. 2012. Vol. 94, № 5. P. 1189-1197. DOI: 10.1007/s00253-012-3905-7.

40. Seo D. H., Jung J. H., Lee J. E., Jeon E. J., Kim W., Park C. S. Biotechnological production of arbutins (α - and β -arbutins), skin-lightening agents, and their derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 95, № 6. P. 1417-1425. DOI: 10.1007/s00253-012-4297-4.

41. Prodanović R., Milosavić N., Sladić D., Zlatović M., Božić B., Veličković T. Ć., Vujčić Z. Transglucosylation of hydroquinone catalysed by α -glucosidase from baker's yeast. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005. Vol. 35, № 4-6. P. 142-146. DOI: 10.1016/j.molcatb.2005.06.011.

42. Milosavić N. B., Prodanović R. M., Jankov R. M. A simple and efficient one-step, regioselective, enzymatic glucosylation of arbutin by α -glucosidase. *Tetrahedron Letters*. 2007. Vol. 48, № 41. P. 7222-7224. DOI: 10.1016/j.tetlet.2007.07.152.

43. Zeuner B., Ståhlberg T., van Buu O. N., Kunov-Kruse A. J., Riisager A., Meyer A. S. Dependency of the hydrogen bonding capacity of the solvent anion on the thermal stability of feruloyl esterases in ionic liquid systems. *Green Chemistry*. 2011. Vol. 13, № 6. P. 1550-1557. DOI: 10.1039/C1GC15115K.

44. Vafiadi C., Topakas E., Nahmias V. R., Faulds C. B., Christakopoulos P. Feruloyl esterase-catalysed synthesis of glycerol sinapate using ionic liquid mixtures. *Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 139, № 1. P. 124-129. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.08.008.

45. Kaki S. S., Grey C., Adlercreutz P. Bioorganic synthesis, characterization and antioxidant activity of esters of natural phenolics and α -lipoic acid. *Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 157, № 4. P. 344-349. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.11.012.

46. Yan H., Wang Z., Chen L., Gong J., Huang H. Synthesis of vitamin E succinate from *Candida rugosa* lipase in organic medium. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2013. Vol. 29, № 2. P. 223-226. DOI: 10.1007/s40242-013-2486-z.

47. Wang J., Wang S., Li Z., Gu S., Wu X., Wu F. Ultrasound irradiation accelerates the lipase-catalyzed synthesis of methyl caffeate in an ionic liquid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2015. Vol. 111. P. 21-28. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.11.006.
48. Costa I. C. R., Sutuli F. K., da Silva G. V. V., Leite S. G. F., Miranda L. S. M., de Souza R. O. M. A. Lipase catalyzed ascorbyl palmitate synthesis under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014. Vol. 102. P. 127-131. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.02.002.
49. Jakovetić S. M., Jugović B. Z., Gvozdenović M. M., Bezbradica D. I., Antov M. G., Mijin D. Z., Knežević-Jugović Z. D. Synthesis of aliphatic esters of cinnamic acid as potential lipophilic antioxidants catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013. Vol. 170, № 7. P. 1560-1573. DOI: 10.1007/s12010-013-0294-z.
50. Xin J. Y., Chen L. I., Zhang Y. X., Wen R. R., Zhao D. M., Xia C. G. Lipase-catalyzed synthesis of α -tocopheryl ferulate. *Food Biotechnology*. 2011. Vol. 25, № 1. P. 43-57. DOI: 10.1080/08905436.2011.547116.
51. Xin J. Y., Zhang L., Chen L. L., Zheng Y., Wu X. M., Xia C. G. Lipase-catalyzed synthesis of feruloyl oleins in solvent-free medium. *Food Chemistry*. 2009. Vol. 112, № 3. P. 640-645. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.024.
52. Adelakun O. E., Kudanga T., Green I. R., le Roes-Hill M., Burton S. G. Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. *Process Biochemistry*. 2012. Vol. 47, № 12. P. 1926-1932. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.06.027.
53. Adelakun O. E., Kudanga T., Parker A., Green I. R., le Roes-Hill M., Burton S. G. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012. Vol. 74, № 1-2. P. 29-35. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.08.010.
54. Kurisawa M., Chung J. E., Uyama H., Kobayashi S. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromolecular Bioscience*. 2003. Vol. 3, № 12. P. 758-764. DOI: 10.1002/mabi.200300038.

55. Kurisawa M., Chung J. E., Uyama H., Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*. 2003. Vol. 4, № 5. P. 1394-1399. DOI: 10.1021/bm034136b.

56. Szczęśna Antczak M., Kubiak A., Antczak T., Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting the efficiency of the process. *Renewable Energy*. 2009. Vol. 34, No. 5. P. 1185–1194. DOI: 10.1016/j.renene.2008.11.013.

57. Черства А. О. Удосконалення технології пресового вилучення ріпакової олії із використанням ферментних препаратів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук : спец. 05.18.06 – технологія жирів, ефірних масел і парфумерно-косметичних продуктів / Черства Альона Олександрівна ; Нац. ун-т харч. технологій. — Київ, 2018. — 18 с.