

УДК 637; 577.15

О. Ю. ШИНКАРУК, М. Д. КУХТИН, О. С. ПОКОТИЛО  
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДОСЛІДНОГО ВАРІАНТУ РІДКОГО  
ЕНЗИМНОГО МИЙНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ САНІТАРНОЇ ОБРОБКИ  
УСТАТКУВАННЯ У МОЛОЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ**

У статті наведено результати фізико-хімічного вивчення дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу. Під час проведених досліджень виявлено, що ензимні мийні засоби можуть втрачати свою активність як під час приготування, так і під час зберігання. У зв'язку з цим необхідно вивчити умови, які впливають на стабільність ензимних мийних засобів, а саме, на його протеолітичну активність (ПА) по відношенню до молочно-білкових забруднень. Метою роботи було визначити основні показники залежності протеолітичної активності мийного засобу від температури, рН і твердості води робочих розчинів.

Було розроблено дослідний варіант рідкого ензимного мийного засобу для санітарної обробки технологічного устаткування у молочної промисловості та визначено його оптимальні фізико-хімічні властивості. Результати проведених досліджень показали, що найоптимальніша протеолітична активність засобу проявляється за температури робочого розчину 60°C, рН 8,35 од. і твердості води 0,357-0,714 мг-екв/л.

Ключові слова: протеолітична активність, ензим, ензимний мийний засіб, температура, рН, твердість води.

О.Ю. ШИНКАРУК, М.Д. КУХТИН, О. С. ПОКОТИЛО  
Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя**ФІЗИКО-ХІМІЧЕСЬКІ СВОЙСТВА ОПЫТНОГО ВАРИАНТА ЖИДКОГО ЭНЗИМНОГО  
МОЮЩЕГО СРЕДСТВА ДЛЯ САНИТАРНОЙ ОБРАБОТКИ ОБОРУДОВАНИЯ В МОЛОЧНОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

В статье приведены результаты физико-химического изучения опытного варианта жидкого энзимного моющего средства. В ходе проведенных исследований выявлено, что энзимные моющие средства могут терять свою активность как во время приготовления, так и во время хранения. В связи с этим необходимо изучить условия, которые влияют на стабильность энзимных моющих средств, а именно, на его протеолитическую активность (ПА) по отношению к молочно-белковым загрязнениям. Целью работы было определить основные показатели зависимости протеолитической активности моющего средства от температуры, рН и жесткости воды рабочих растворов.

Был разработан опытный вариант жидкого энзимного моющего средства для санитарной обработки технологического оборудования в молочной промышленности и определены его оптимальные физико-химические свойства. Результаты проведенных исследований показали, что оптимальная протеолитическая активность средства проявляется при температуре рабочего раствора 60 °С, рН 8,35 од. и жесткости воды 0,357-0,714 мг-экв / л.

Ключевые слова: протеолитическая активность, энзим, энзимное моющее средство, температура, рН, жесткость воды.

О.Ю. SHYNKARUK, M.D. KUKHTYN, O. S. POKOTYLO  
Ternopil Ivan Puluj National Technical University**PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE INVESTIGATED ANALOGUE OF A LIQUID  
ENZYME DETERGENT INTENDED FOR SANITIZATION PURPOSES EQUIPMENT IN DAIRY  
INDUSTRY**

The article describes the results of physical and chemical study for the investigated analogue of a liquid enzyme detergent. During the studies it was found that enzyme detergent may lose its activity both during preparation and storage. In this connection it is necessary to examine the conditions that affect the stability of enzyme detergents, in particular, its proteolytic activity (PA) in relation to milk-protein contaminants. The research aimed at identifying the key indicators for the dependence of the detergent's proteolytic activity on temperature, pH and water hardness of work solution.

The investigated analogue of a liquid enzyme detergent intended for sanitization purposes in dairy industry was developed for this purpose and its optimal physical and chemical properties were identified. The

studies showed that the most optimal proteolytic activity appears at 60 °C temperature of the work solution, pH 8.35, and water hardness 0,357-0,714 mEq / L.

Keywords: proteolytic activity, enzyme, enzyme detergent, temperature, pH, water hardness.

### Постановка проблеми

Якість молока та молочної продукції, а також їх епідеміологічна безпека значною мірою залежать від санітарного стану технологічного обладнання, інвентарю і тари, що досягається за рахунок строгого дотримання на підприємстві таких важливих операцій як миття і дезінфекція [1, 2].

На ринку України наявні вітчизняні та імпортовані мийні, дезінфікуючі та мийно-дезінфікуючі засоби, які поділяють на лужні та кислотні. Вони бувають прості, що складаються з однієї активної речовини, та складні, що є композицією різних простих мийних засобів або створюються на основі поверхнево-активних речовин. У якості дезінфікуючих речовин використовують переважно хлоровмісні сполуки, також ЧАС, перекис водню, надощтову кислоту.

Перелік мийних і дезінфікуючих засобів для обробки посуду, технологічного устаткування й тари, призначених для контакту з молочними продуктами, періодично переглядається Міністерством охорони здоров'я України. Затверджений перелік є офіційним та керівним документом при виборі засобу для санітарної обробки

Проте із підвищенням мікробіологічних вимог до молочних продуктів в останні роки широкого застосування у молочної промисловості набувають мийні засоби із ензимами. Це пов'язано з тим, що мікроорганізми більшу частину свого існування на абіогенних поверхнях перебувають у біоплівці. Біоплівка – це жива сукупність одного або декількох видів чи родів бактерій, яка постійно оновлюється, прикріплена до біогенної чи абіогенної поверхні та оточена полісахаридним матриксом [3]. Матрикс – це суміш екзополісахаридів, білків, нуклеїнових кислот та інших неорганічних речовин, який захищає бактерії від факторів навколишнього середовища [4, 5]. Бактерії сформовані у мікробні біоплівки на поверхні технологічного устаткування є основним джерелом обсіяння молока та молочних продуктів. Це пояснюється тим, що мікроорганізми, які сформовані у біоплівки більш стійкі до розчинів дезінфікуючих засобів, ніж планктонні клітини. Тому, навіть після доброї санітарної обробки доїльного устаткування, бактерії можуть залишатися на його поверхні [6, 7].

Актуальність застосування ензимних засобів пов'язане з їх доброю ферментативною активністю щодо молочних відкладень, а також здатністю руйнувати мікробні біоплівки [8, 9, 10, 11].

### Аналіз останніх досліджень і публікацій

Нині в Україні практично відсутнє виробництво таких ензимних засобів. Відомий лише засіб «Біомой», який містить ензим лужну протеазу і проявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості та видаляє білкові забруднення. Однак, завдяки вмісту сульфанола у складі «Біомою», його не можливо застосовувати у СІР-установках через значну пінність [12].

Закордонні мийні засоби із ензимами занадто дорогі для вітчизняного виробника і не завжди враховують твердість води на молокопереробних підприємствах України.

На вітчизняному ринку поширені такі протеолітичні ферменти, як Everlase і Savinase, компанія-виробник Novozymes A/S, Данія [13]. Провівши літературний аналіз та лабораторні дослідження, ми для створення ензимного мийного засобу використали ензим Savinase.

Savinase – це протеолітичний ензим, який секретується алкалофільними бактеріями *Bacillus Lentus* і здатний гідролізувати пептидні зв'язки у білках.

Проте, ензимні мийні засоби можуть втрачати свою активність як під час приготування, так і під час зберігання.

У зв'язку з цим необхідно вивчити умови, які впливають на стабільність ензимних мийних засобів, а саме, на його протеолітичну активність (ПА) по відношенню до молочно-білкових забруднень [14].

### Формулювання мети дослідження

Метою роботи було визначення оптимальних фізико-хімічних властивостей дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу для санітарної обробки технологічного устаткування у молочної промисловості.

### Викладення основного матеріалу дослідження

Експериментальні дослідження проводили у лабораторіях Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Протеолітичну активність ензимного мийного засобу визначали у відповідності з вимогами, вказаними у патенті SU 1065742 А [15]. Для цього брали три пробірки: у першу пробірку вносили 5 см<sup>3</sup> 5%-го водного розчину молока і 20 см<sup>3</sup> води дистильованої, у другу – 5 см<sup>3</sup> води дистильованої і 20 см<sup>3</sup> 1%-го водного розчину ензиму (ензимного мийного засобу), у третю – 5 см<sup>3</sup> 5%-го водного розчину молока і 20 см<sup>3</sup> 1%-го водного розчину ензиму (ензимного мийного засобу). Перемішували, підігрівали до температури 50°C і витримували при цій температурі. Після витримки у три інші пробірки вносили по

20 см<sup>3</sup> води дистильованої і по 5 см<sup>3</sup> відповідних розчинів. Вимірювали оптичну густину розчинів спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нМ [3].

Протеолітичну активність А, %, визначали за формулою:

$$A = \frac{D_0 - (D_2 - D_1)}{D_0} \times 100,$$

де А – протеолітична активність ензиму (ензимного мийного засобу);

$D_0$  – оптична густина водного розчину молока;

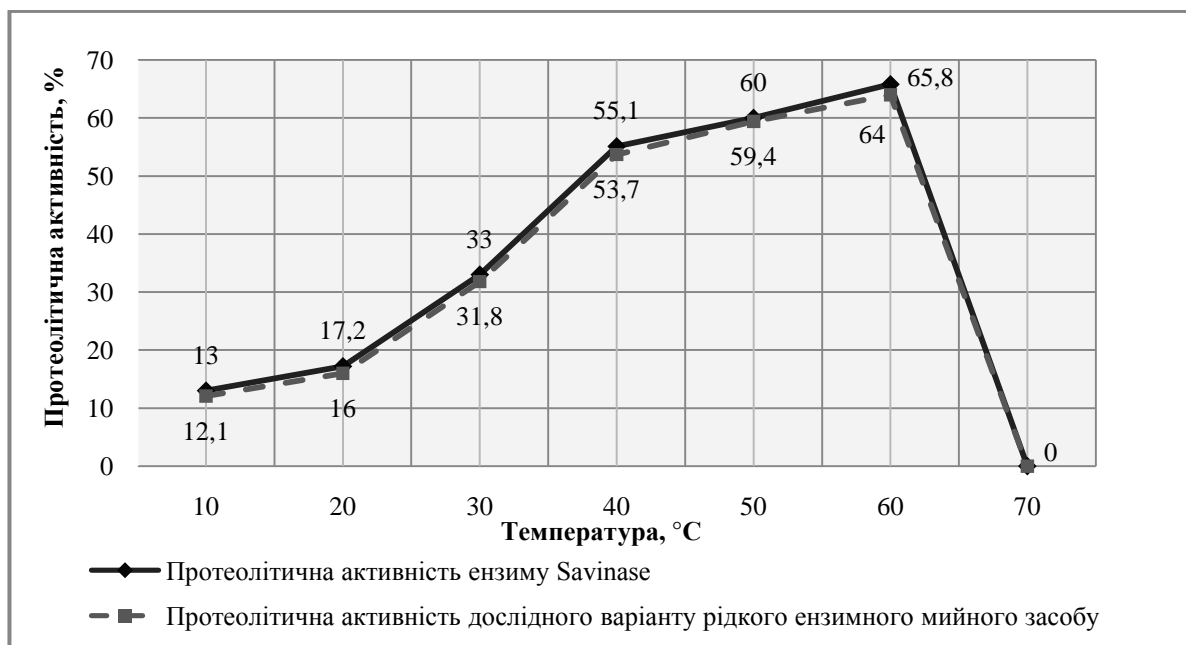
$D_2$  – оптична густина суміші водних розчинів молока та ензиму (ензимного мийного засобу);

$D_1$  – оптична густина водного розчину ензиму (ензимного мийного засобу).

Визначення концентрації водневих іонів (рН) проводили за допомогою рН-метра 150.

Для визначення твердості води використовували набір AQUATEST.

Нами було встановлено, що одним із важливих факторів, які впливають на протеолітичну активність ензиму Savinase і дослідного варіанту ензимного мийного засобу, є температура їх робочих розчинів. Результати досліджень впливу різних температур робочих розчинів на активність ензиму Savinase і дослідного варіанту мийного засобу наведено на рис.1.



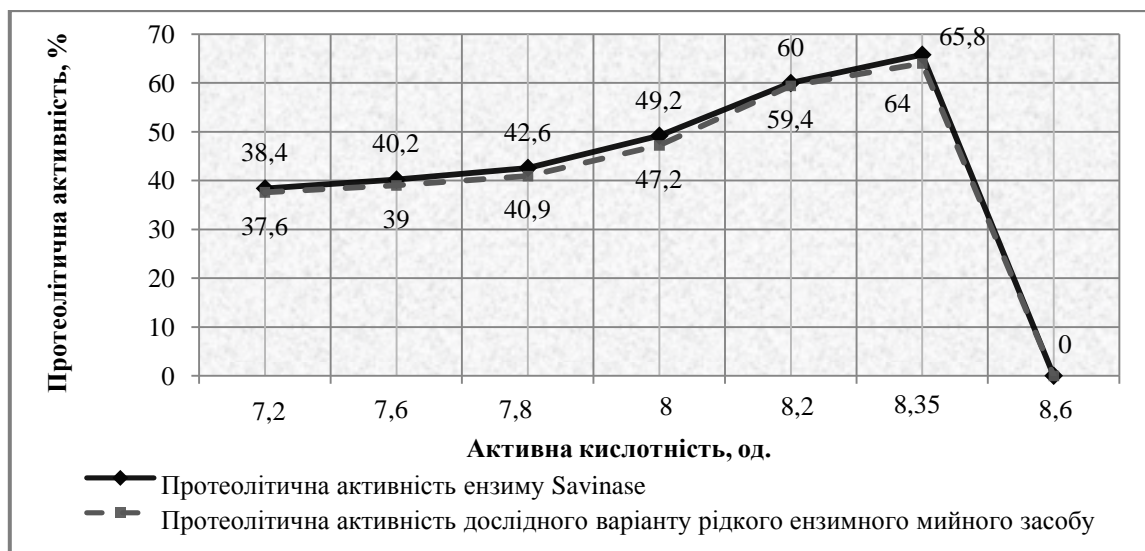
**Рис. 1. Протеолітична активність ензиму Savinase та дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу, залежно від температури їх розчинів за рН 8,35 од. і твердості води 0,357 мг-екв/л**

Із рис. 1 видно, що за температури 10°C протеолітична активність ензиму Savinase складала 13%. При збільшенні температури до 30°C активність зросла у 2,5 раза ( $P \leq 0,05$ ), а при наступному збільшенні температури до 50°C – у 4,6 раза, порівняно з температурою 10°C. Найвища активність ензиму щодо молочних білків спостерігалася за температури 60°C і становила 65,8%. З підвищенням температури вище 60°C активність знижується, у зв'язку з тим, що ензими денатуруються, адже висока температура призводить до змін у первинній структурі і конформації ензиму [14].

Практично таку саму закономірність відмічали у дослідному варіанті ензимного мийного засобу, яка характеризувалася поступовим збільшенням протеолітичної активності з підвищенням температури робочих розчинів. В той же час, якщо порівняти ПА Savinase і дослідного варіанту мийного засобу, то у мийному ензимному засобі ПА на 1-2% нижча.

Таким чином, проведені дослідження вказують на те, що досягнення максимальної дії протеолітичної активності ензимного мийного засобу на білки молока можливе за температури 60°C.

На рис.2 наведено результати досліджень залежності протеолітичної активності ензиму Savinase і дослідного варіанту ензимного мийного засобу від рН їх розчинів.

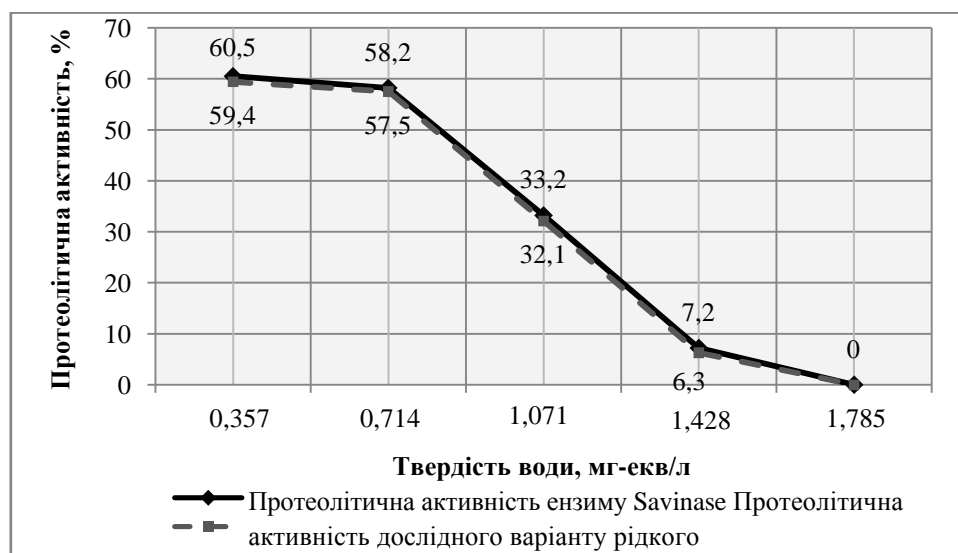


**Рис. 2.** Протеолітична активність ензиму Savinase та дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу залежно від активної кислотності їх розчинів за температури 60°C і твердості води 0,357 мг-екв/л

Протеолітична активність ензиму Savinase і дослідного варіанту ензимного засобу за рН 7,2 од. становить 38,4% і 37,6% відповідно. Збільшення рН розчинів на одну одиницю до 8,2 підвищувало протеолітичну активність в 1,3 раза до 49,2-47,2%. За рН розчинів 8,35 од. протеолітична активність зросла у 1,7 раза ( $P \leq 0,01$ ), порівняно з рН 7,2 од. і досягла своєї максимальної активності 65,8-64%. Подальше збільшення рН розчинів від 8,35 од. до 8,6 од. сприяло поступовому інгібуванню ензимів, внаслідок чого протеолітична активність знижувалася до 0.

Отже, найбільшу протеолітичну активність ензимного мийного засобу можливо досягнути при рН розчинів 8,35 од. Збільшення рН до 8,6 од. знижує протеолітичну активність як самого ензиму, так і варіанту дослідного засобу.

У наступній серії дослідів нами досліджено залежність протеолітичної активності мийного засобу від твердості води. Визначення протеолітичної активності проводили за рН розчинів 8,35 од. і температури розчинів 60°C. Результати досліджень наведено на рис.3.



**Рис. 3.** Протеолітична активність ензиму Savinase та дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу залежно від твердості води їх розчинів за температури 60°C і рН 8,35 од.

Із рис.3 видно, що при збільшенні твердості води робочого розчину протеолітична активність ензиму і дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу різко знижується. Найоптимальніша ПА ензиму Savinase проявляється за твердості води 0,357 мг-екв/л. При збільшенні твердості води до

0,714 мг-екв/л ПА ензиму зменшується на 2,3%, а при значенні 1,071 мг-екв/л – на 25% та на 26% ( $P \leq 0,05$ ) за твердості води 1,428 мг-екв/л. Вода із твердістю 1,785 мг-екв/л і вище негативно впливає на протеолітичну активність ензиму аж до повного його інгібування.

Протеолітична активність дослідного варіанту ензимного мийного засобу за твердості води 0,357 мг-екв/л також досягала максимуму і становила 60,5%, а при збільшенні твердості води від 0,714 до 1,071 мг-екв/л ПА знижувалася на 25,4% ( $P \leq 0,05$ ), тобто зі збільшенням твердості води ПА відповідно знижується.

Незначне зменшення ПА у дослідному варіанті ензимного засобу, порівняно із ензимом Savinase пояснюється тим, що наявні комплекси у складі засобу здатні зв'язувати іони кальцію, зменшуючи при цьому активність ензимів [14].

Отже, проведені дослідження вказують, що розроблений варіант рідкого ензимного мийного засобу за твердості води 0,357 мг-екв/л проявляє високу протеолітичну активність щодо білків молока і не суттєво поступається ензиму Savinase.

#### Висновки

1. Розроблено дослідний варіант рідкого ензимного мийного засобу для санітарної обробки технологічного устаткування у молочній промисловості та визначено його оптимальні фізико-хімічні властивості.

2. Найоптимальніша протеолітична активність дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу проявляється за температури робочого розчину 60°C, рН 8,35 од. і твердості води 0,357-0,714 мг-екв/л.

#### Список використаної літератури

1. Міщиряк В.Г. Сучасні гігієнічні вимоги до миття та дезінфекції на харчових підприємствах [Текст] / В.Г. Міщиряк. – Донецьк, 2012. – 32 с.
2. Ушакова В.Н. Мойка и дезинфекция. Пищевая промышленность, торговля, общественное питание [Текст] / В.Н.Ушакова. – СПб. : Профессия, 2009. – С.50.
3. Watnik P. Biofilm, lity of Microbes / P. Watnik, R. Kolter // J. Bacteriol. – 2000. – №10. – Vol.182. – P. 2675–2679.
4. Donlan R.M. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganism / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol Rev. Arr. – 2002. – №2. – Vol.15. – P. 167–193.
5. Costerton J.W. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Science 1999. – Vol.284. – P. 318–322.
6. Flint S. H. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control / S. H. Flint, P. J. Bremer, J. D. Brooks // Biofouling. – 2009. – Vol.11. – P. 81–97.
7. Bremer P. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms / P. Bremer, J. Suzanne Fillery, A. James McQuillan // Int. J. Food Microbiol. – 2006. – Vol.106. – P. 254–262.
8. Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности [Текст] / Л. В. Мармузова. – М. : Академия, 2003. – 132 с.
9. Шингарева Т.И. Санитария и гигиена молока и молочных продуктов [Текст]/ Т. И. Шингарева. – Минск : ИВЦ Минфин, 2007. – 328 с.
10. Кухтин М.Д. Сучасні погляди на санітарну обробку технологічного устаткування в харчовій промисловості / М.Д. Кухтин, Ю.Б. Перкій, В.І. Семанюк // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. – Львів. – 2012. – Т. 14, № 3 (53). – Ч. 3. – С. 302–307.
11. Кухтин М.Д. Формування мікробних біоплівки на поверхнях різних матеріалів мікроорганізмами, які виділені з технологічного устаткування / М.Д. Кухтин, Ю.Б. Перкій, Н.В. Крушельницька // Ветеринарна біотехнологія. – Ніжин: ПП Лисенко М.М., 2013. – № 22. – С. 292–297.
12. Технологічна інструкція із використання мийного засобу «Біомой» для миття на молочних фермах та молокопереробних підприємствах, узгоджено висновком державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 05.03.02-07/66023 від 23.07.2013 р., Київ, 2013. – 9 с.
13. Novozymes Savinase®. – Режим доступу: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)
14. Чешкова А.В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха [Текст] / А.В. Чешков // Учеб.пособие для вузов. – И. : ГОУВПО ИГХТУ, 2007. – 282 с.
15. Пат. SU 1065742 А Союз Советских Социалистических Республик, МПК: G01N 21/00. Способ определения протеолитической активности моющих средств, содержащих ферменты / Мицквявичюс Е. К., Бингялене И. Б. ; заявитель и патентообладатель Литовский филиал всесоюзного научно-исследовательского института маслodelьной и сыродельной промышленности. - № 3506503 ; заявл. 25.10.82 ; опубл. 7.01.84, Бюл. № 1.