

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації**

«На правах рукопису»
УДК [582.284:577.151.54]:687

До захисту допущено:
в.о. завідувача кафедри
_____ Валентина ПОЛІЩУК
« 17 » травня 20 23 р.

**Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра
за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Закономірності росту та синтезу лігноцелюлолітичних
ферментів дереворуйнівними макроміцетами на середовищах з
екстрактами тирси деревини»**

Виконав:
студент VI курсу, групи БТ-11мн
Зубик Павло Романович _____

Науковий керівник:
доц. каф. пром. біотехнології та біофармації, к.т.н., доц.
Клечак Інна Рішардівна _____

Консультант зі стартапу:
доц. каф. економіки і підприємництва, к.е.н., доц.
Погребняк Анна Юріївна _____

Рецензент:
провідн. н.с. відділу мікології
Ін-т ботаніки ім. М. Г. Холодного,
д.б.н., проф.
Бісько Ніна Анатоліївна _____

Засвідчую, що у цій магістерській
дисертації немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.
Студент _____

Київ – 2023 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-наукова програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

« 15 » березня 20 23 р.

ЗАВДАННЯ
на магістерську дисертацію студенту

Зубику Павлу Романовичу

1. Тема дисертації «Закономірності росту та синтезу лігноцелюлолітичних ферментів дереворуйнівними макроміцетами на середовищах з екстрактами тирси деревини», науковий керівник дисертації Клечак Інна Рішардівна, к.т.н., доцент, затвержені наказом по університету від « 19 » квітня 20 23 р. № 1534-с

2. Термін подання студентом дисертації 16.05.2023

3. Об'єкт дослідження

Штами базидієвих грибів видів *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. і *T. versicolor* (L.) Lloyd та їх біологічні властивості.

4. Предмет дослідження

Особливості росту та синтезу лігнолітичних та целюлолітичних ферментів базидієвими грибами на середовищах, що містять екстракти тирси деревини.

5. Перелік завдань, які потрібно розробити: провести скринінг середовищ на основі екстрактів тирси деревини для культивування базидієвих макроміцетів за швидкістю росту та індукуванням ферментативної активності; вивчити вплив екстрактів на культуральні показники та синтез лігноцелюлолітичних ферментів у стаціонарній культурі на рідких поживних середовищах; визначити дію деревних екстрактів на ростові характеристики і продукування

оксидоредуктаз та гідролаз при глибинному культивуванні; встановити наявність кореляційних залежностей між досліджуваними показниками, знебарвленням барвників і активністю оксидаз у культуральній рідині; розробити стартап проєкт ферментного препарату на основі отриманого в ході дослідження напівпродукту.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: фотографії морфології макроміцетів на досліджуваних середовищах; динаміка росту штамів у поверхневій культурі; діаграми виходу біомаси та ферментативної активності у стаціонарній та глибинній культурі.

7. Орієнтовний перелік публікацій 1 стаття, 5 тез конференцій

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Стартап	Погребняк А. Ю. доц. каф. економіки і підприємництва		

9. Дата видачі завдання 15.03.2023

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1.	Огляд літератури	15.03.23 – 19.03.23	
2.	Планування експериментальних досліджень	20.03.23 – 22.03.23	
3.	Проведення експериментальних досліджень	23.03.23 – 30.04.23	
4.	Обробка даних та написання експериментальної частини	10.04.23 – 05.05.23	
5.	Розробка стартап проєкту	06.05.23 – 09.05.23	
6.	Оформлення магістерської дисертації	10.05.23 – 16.05.23	
7.	Подання дисертації до ЕК	17.05.2023р.	

Студент

Павло ЗУБИК

Науковий керівник

Інна КЛЕЧАК

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація на тему «Закономірності росту та синтезу лігноцелюлолітичних ферментів дереворуйнівними макроміцетами на середовищах з екстрактами тирси деревини» обсягом 133 сторінки містить 20 ілюстрацій, 36 таблиць, 155 джерел літератури.

Актуальність роботи. Базидієві макроміцети відомі своєю здатністю рости на різних промислових відходах та продукувати низку корисних біологічно активних сполук, в тому числі лігноцелюлолітичних ферментів, які використовуються для деструкції органічних сполук. Водночас із розвитком промисловості збільшується негативний вплив на довкілля, в першу чергу через використання сполук, що не розкладаються у природі, наприклад, синтетичних барвників. Використання ферментних препаратів дозволило б вирішити цю проблему. Крім того, в Україні відсутнє виробництво лігноцелюлолітичних ферментів, тому тема є актуальною.

Робота виконувалась в рамках науково-дослідної теми №0122U201952 «Наукові засади використання базидієвих грибів в біотехнології».

Метою роботи є дослідження особливостей росту та ферментативної активності макроміцетів на середовищах, що містять екстракти тирси деревини.

Завданнями роботи є:

- провести скринінг середовищ на основі екстрактів тирси деревини для культивування базидієвих макроміцетів за швидкістю росту та індукуванням ферментативної активності;
- вивчити вплив екстрактів на культуральні показники та синтез лігноцелюлолітичних ферментів у стаціонарній культурі на рідких поживних середовищах;
- визначити дію деревних екстрактів на ростові характеристики і продукування оксидоредуктаз та гідролаз при глибинному культивуванні;

- встановити наявність кореляційних залежностей між досліджуваними показниками, знебарвленням барвників і активністю оксидаз у культуральній рідині;
- розробити стартап проект ферментного препарату на основі отриманого в ході дослідження напівпродукту.

Об'єкт дослідження. Штами базидієвих грибів видів *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. і *T. versicolor* (L.) Lloyd та їх біологічні властивості.

Предмет дослідження. Особливості росту та синтезу лігнолітичних та целюлолітичних ферментів базидієвими грибами на середовищах, що містять екстракти тирси деревини.

Методи дослідження. Основними методами досліджень, що були застосовані у роботі, є мікробіологічні, мікологічні, біохімічні, фізико-хімічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше використано екстракти берези, осики, бука та дуба як основу поживних середовищ для культивування 7 штамів базидієвих грибів. Вивчено культурально-морфологічні особливості росту макроміцетів на середовищах, що містять деревні екстракти, та досліджено вплив екстрактів на індукування синтезу окиснювальних ферментів.

Встановлено вплив середовищ, що містять екстракти тирси бука, на підвищення питомої лакказної активності у *T. versicolor* 353 (у 5 разів).

Вперше встановлено, що культуральна рідина *T. versicolor* 353, отримана після глибинного культивування на середовищі з додаванням екстракту тирси бука, може знебарвлювати метиленовий синій (на 98,9 %) та індигокармін (на 97,2 %).

Вперше виявлено, що знебарвлення гетероциклічних барвників корелюється із активністю тирозинази.

Практичне значення одержаних результатів. В результаті роботи було запропоновано культуральну рідину *T. versicolor* 353 після культивування на середовищі з екстрактом тирси бука, як напівпродукт лігноцелюлолітичних

ферментів, що може бути використаний для створення відповідного ферментного препарату та застосований у паперовій, деревообробній, текстильній та інших галузях промисловості.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень за темою дисертації оприлюднені на XVI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (3 червня 2022 року), VI Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології» (23-24 вересня 2022 року), XI Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (8 листопада 2022 року), IV Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology (15-17 November 2022).

Публікації:

1. Зубик П., Клечак І., Сироїд О. Потенціал використання продуктів деревообробної промисловості для глибинного культивування базидієвих грибів. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: матеріали II Міжнар. науково-практ. інтернет-конф., м. Харків, 20 трав. 2022 р. С. 112–114.

2. Зубик П., Клечак І., Сироїд О. Перспективи застосування наноматеріалів на основі сполук базидіоміцетів у вирішенні екологічних питань. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали XVI Всеукр. науково-практ. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених, м. Київ, 3 черв. 2022 р. С. 43-44.

3. Зубик П., Клечак І. Вплив деревних гідролізатів на ріст *Pleurotus ostreatus* у поверхневій культурі. *Новітні досягнення біотехнології*: матеріали VI Міжнар. науково-практ. конф., м. Київ, 23-24 вересня 2022 р. С. 48-49.

4. Зубик П., Водні екстракти букоцвітих — потенційні індуктори оксидаз дереворуйнівних базидіоміцетів. *Новітні досягнення біотехнології*: матеріали VI Міжнар. науково-практ. конф., м. Київ, 23-24 вересня 2022 р. С. 49-50.

5. Зубик П., Клечак І. Інтенсифікація синтезу ферментів-оксидаз базидіоміцетів роду *Coriolus* у поверхневій культурі. *Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті*

євроінтеграції: матеріали XI Міжнар. науково-техн. Конф., м. Київ, 8 листопада 2022. С. 33-34.

6. Zubyk P., Klechak I. The growth of *Trametes versicolor* on wood hydrolyzate in submerged culture. *Youth and modern problems of microbiology and virology: IV Young Scientists Conference*, Kyiv, 15-17 November 2022. P. 32.

7. Зубик П., Клечак І. Культурально-морфологічні особливості росту *Trametes versicolor* (*Polyporaceae*) на середовищах, що містять деревні екстракти. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2023. Т. 7, № 1. С. 24–33. URL: <https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.1.274343>.

МАКРОМІЦЕТИ, *TRAMETES VERSICOLOR*, *PLEUROTUS OSTREATUS*, ЕКСТРАКТИ ТИРСИ, ЦЕЛЮЛАЗА, ЛАККАЗА, ПЕРОКСИДАЗИ, ТИРОЗИНАЗА, ІНТЕНСИФІКАЦІЯ, КУЛЬТУРАЛЬНА РІДИНА, ЗНЕБАРВЛЕННЯ, БАРВНИКИ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	10
ВСТУП.....	11
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	16
1.1. Макроміцети – деструктори лігнінцелюлозної біомаси	16
1.2. Ферменти базидієвих макроміцетів	17
1.2.1. Целюлаза	19
1.2.2. Лакказа	20
1.2.3. Манганзалежна пероксидаза	21
1.2.4. Лігнінпероксидаза	21
1.2.5. Тирозиназа	22
1.3. Методи отримання лігноцелюлозних ферментів.....	22
1.3.1. Твердофазне культивування	23
1.3.2. Глибинне культивування.....	24
1.4. Застосування лігноцелюлолітичних ферментів для знебарвлення барвників	27
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	30
2.1. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	30
2.1.1. Об'єкти дослідження	30
2.1.2. Приготування екстрактів тирси деревини.....	31
2.1.3. Поживні середовища та їх приготування	31
2.1.4. Умови культивування	33
2.1.5. Дослідження росту макроміцетів за різних умов культивування..	34
2.1.6. Визначення основних аналітичних показників.....	35
2.1.7. Визначення ферментативної активності.....	36

2.1.8. Знебарвлення синтетичних барвників	37
2.1.9. Визначення макростехіометричних показників культивування	38
2.1.10. Статистична обробка результатів.....	39
2.2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	40
2.2.1. Дослідження впливу екстрактів тирси на біотехнологічні характеристики макроміцетів у поверхневій культурі.....	40
2.2.2. Дослідження впливу екстрактів тирси на біотехнологічні характеристики макроміцетів у стаціонарній культурі.....	45
2.2.3. Дослідження впливу екстрактів тирси на біотехнологічні характеристики макроміцетів у глибинній культурі	56
3. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЄКТУ	71
3.1. Резюме стартап проєкту	71
3.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу	75
3.3. Визначення ключових факторів успіху проєкту.....	78
3.4. Визначення потенційних споживачів	80
3.5. Ціна пропозиції на ринку	81
3.6. Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів реалізації проєкту	89
3.7. Ризики стартап проєкту та методи управління ними	91
ВИСНОВКИ	101
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	103
Додаток А.....	119
Додаток Б	126
Додаток В.....	129
Додаток Г	130

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Po – *P. ostreatus*

Tv – *T. versicolor*

АСБ – абсолютно суха біомаса

БФ – бромфеноловий синій

ГВ – генціанвіолет

ІК – індигокармін

ЛП – лігнінпероксидаза

МЗ – малахітовий зелений

МП – манганпероксидаза

МС – метиленовий синій

ПКМЦА – питома карбоксиметилцелюлазна активність

ПЛА – питома лакказна активність

ПЛПА – питома лігнінпероксидазна активність

ПМПА – питома манганпероксидазна активність

ПТА – питома тирозиназна активність

ПЦА – питома целюлазна активність

СЗБ – ступінь знебарвлення барвника

СНА-Бк – середовище Норкранс агаризоване на основі екстракту тирси бука

СНА-Бр – середовище Норкранс агаризоване на основі екстракту тирси берези

СНА-К – середовище Норкранс агаризоване на основі води (контрольне)

СНА-О – середовище Норкранс агаризоване на основі екстракту тирси осики

СНА-Д – середовище Норкранс агаризоване на основі екстракту тирси дуба

СН-Бк – середовище Норкранс на основі екстракту тирси бука

СН-Бр – середовище Норкранс на основі екстракту тирси берези

СН-Д – середовище Норкранс на основі екстракту тирси дуба

СН-К – середовище Норкранс на основі води (контрольне)

ВСТУП

Базидієві макроміцети відомі своєю здатністю продукувати корисні біологічно-активні сполуки [1]. Значний інтерес до їх застосування обумовлений здатністю до розкладання рослинних полімерів (як целюлози, так і лігніну) [2], тому культивування макроміцетів на таких субстратах є перспективним напрямом для утилізації агропромислових відходів [3].

Широке застосування базидієвих макроміцетів у біотехнології також обумовлене і здатністю до синтезу ряду біологічно активних сполук, в тому числі екзоферментів [4]. Найвідомішими представниками макроміцетів, що часто застосовуються з метою отримання ферментів, є *Pleurotus ostreatus* і *Trametes versicolor* [5]. Основними типами ферментів, що продукуються під час розкладання лігнінцелюлозної біомаси, є пероксидази (лігнін- та манган-), оксидази (монофенол- та дифенол-) і гідролази (целюлази) тощо. Тому пошук методів інтенсифікації їх синтезу все частіше стає предметом наукових праць [5 – 8].

Лігноцелюлозні ферменти знайшли багато напрямків біотехнологічного застосування. Зокрема, вони застосовуються у паперовій промисловості (при відбілюванні целюлози чи делігніфікації паперу) [10], текстильній (для покращення якості тканин) [11], харчовій (при освітленні соків) [12], сільському господарстві (у покращенні якості кормів) [13] та біоремедіації забрудненого середовища і утилізації відходів (деструкції фармацевтичних сполук, поліфенолів, барвників, хлорфенолів) [13, 14]. Особливу увагу в останні роки привернула біоремедіація синтетичних барвників, які широко використовуються в різних промислових технологіях, а їх викид у навколишнє середовище може призвести до серйозних екологічних проблем [16]. Використання лігноцелюлозних ферментів є багатообіцяючою альтернативою для біоремедіації забруднених барвниками стічних вод [17]. Тому вивчення способів інтенсифікації синтезу ферментів базидієвих макроміцетів (в тому

числі шляхом використання агропромислових відходів) для їх застосування у вирішенні питань деколоризації синтетичних барвників є *актуальним*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Магістерська дисертація виконувалася на кафедрі промислової біотехнології та біофармації Національного технічного університету України Київського політехнічного інституту імені Ігоря Сікорського в рамках науково-дослідної теми «Наукові засади використання базидієвих грибів в біотехнології» (Реєстраційний номер в системі НДДКР 0122U201952. Дата реєстрації: 29-12-2022).

Метою роботи є дослідження особливостей росту та ферментативної активності макроміцетів на середовищах, що містять екстракти тирси деревини.

Завданнями роботи є:

- провести скринінг середовищ на основі екстрактів тирси деревини для культивування базидієвих макроміцетів за швидкістю росту та індукуванням ферментативної активності;
- вивчити вплив екстрактів на культуральні показники та синтез лігноцелюлолітичних ферментів у стаціонарній культурі на рідких поживних середовищах;
- визначити дію деревних екстрактів на ростові характеристики і продукування оксидоредуктаз та гідролаз при глибинному культивуванні;
- встановити наявність кореляційних залежностей між досліджуваними показниками, знебарвленням барвників і активністю оксидаз у культуральній рідині;
- розробити стартап проєкт ферментного препарату на основі отриманого в ході дослідження напівпродукту.

Об'єкт дослідження. Штами базидієвих грибів видів *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. і *T. versicolor* (L.) Lloyd та їх біологічні властивості.

Предмет дослідження. Особливості росту та синтезу лігнолітичних та целюлолітичних ферментів базидієвими грибами на середовищах, що містять екстракти тирси деревини.

Методи дослідження. Основними методами досліджень, що були застосовані у роботі, є мікробіологічні, мікологічні, біохімічні, фізико-хімічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше використано екстракти берези, осики, бука та дуба як основу поживних середовищ для культивування 7 штамів базидієвих грибів. Вивчено культурально-морфологічні особливості росту макроміцетів на середовищах, що містять деревні екстракти, та досліджено вплив екстрактів на індукування синтезу окиснювальних ферментів.

Встановлено вплив середовищ, що містять екстракти тирси бука, на підвищення питомої лакказної активності у *T. versicolor* 353 (у 5 разів).

Вперше встановлено, що культуральна рідина *T. versicolor* 353, отримана після глибинного культивування на середовищі з додаванням екстракту тирси бука, може знебарвлювати метиленовий синій (на 98,9 %) та індигокармін (на 97,2 %).

Вперше виявлено, що знебарвлення гетероциклічних барвників корелюється із активністю тирозинази.

Практичне значення одержаних результатів. В результаті роботи було запропоновано культуральну рідину *T. versicolor* 353 після культивування на середовищі з екстрактом тирси бука, як напівпродукт лігноцелюлолітичних ферментів, що може бути використаний для створення відповідного ферментного препарату та застосований у паперовій, деревообробній, текстильній та інших галузях промисловості.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень за темою дисертації оприлюднені на XVI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (3 червня 2022 року), VI Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення

біотехнології» (23-24 вересня 2022 року), XI Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (8 листопада 2022 року), IV Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology (15-17 November 2022).

Публікації:

1. Зубик П., Клечак І., Сироїд О. Потенціал використання продуктів деревообробної промисловості для глибинного культивування базидієвих грибів. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: матеріали II Міжнар. науково-практ. інтернет-конф., м. Харків, 20 трав. 2022 р. С. 112–114.

2. Зубик П., Клечак І., Сироїд О. Перспективи застосування наноматеріалів на основі сполук базидіоміцетів у вирішенні екологічних питань. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали XVI Всеукр. науково-практ. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених, м. Київ, 3 черв. 2022 р. С. 43-44.

3. Зубик П., Клечак І. Вплив деревних гідролізатів на ріст *Pleurotus ostreatus* у поверхневій культурі. *Новітні досягнення біотехнології*: матеріали VI Міжнар. науково-практ. конф., м. Київ, 23-24 вересня 2022 р. С. 48-49.

4. Зубик П., Водні екстракти букоцвітих — потенційні індуктори оксидаз дереворуйнівних базидіоміцетів. *Новітні досягнення біотехнології*: матеріали VI Міжнар. науково-практ. конф., м. Київ, 23-24 вересня 2022 р. С. 49-50.

5. Зубик П., Клечак І. Інтенсифікація синтезу ферментів-оксидаз базидіоміцетів роду *Coriolus* у поверхневій культурі. *Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції*: матеріали XI Міжнар. науково-техн. Конф., м. Київ, 8 листопада 2022. С. 33-34.

6. Zubyk P., Klechak I. The growth of *Trametes versicolor* on wood hydrolyzate in submerged culture. *Youth and modern problems of microbiology and virology*: IV Young Scientists Conference, Kyiv, 15-17 November 2022. P. 32.

7. Зубик П., Клечак І. Культурально-морфологічні особливості росту *Trametes versicolor* (*Polyporaceae*) на середовищах, що містять деревні

экстракти. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2023. Т. 7, № 1. С. 24–33.
URL: <https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.1.274343>.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Макроміцети – деструктори лігнінцелюлозної біомаси

Дереворуйнівні гриби – особливо важливі об'єкти лісових екосистем [18], а за визначених умов середовища є найефективнішими перетворювачами рослинної біомаси [19]. Їх основною функцією є розкладання структурних компонентів деревини (целюлози, лігніну) [20], внаслідок чого вони відіграють важливу роль у покращенні якості ґрунту та сукцесії [21], біогеохімічного циклу нутрієнтів [22], балансуванні кількості вуглецю у природі [23], є індикаторами біорізноманіття тощо [24].

Гриби, які викликають гниття деревини, часто називають ксилотрофними. Це збірний термін, що стосується усіх видів, які здатні до росту на лігнінцелюлозному матеріалі та його перетворення [25]. Гриби-ксилотрофи належать до відділів *Basidiomycota*, *Ascomycota* та *Mucoromycota* [20]. Базидієві макроміцети становлять більшу частину дереворуйнівних макроміцетів [26], які найчастіше включені в порядки *Agaricales* та *Polyporales* [27].

Гниття (розклад/деструкція/руйнування тощо) лігнінцелюлозного матеріалу – це сукупність біологічних процесів впливу на компоненти клітинної стінки рослин [28], основними компонентами якої є полісахариди та лігнін, що робить ці сполуки найпоширенішими біополімерами планети [29]. Вони належать до відновлюваних джерел фенольних та вуглеводних сполук. Крім того, лігнін та целюлоза є побічними продуктами біопереробних виробництв (целюлозної та паперової промисловості) [30].

Ксилотрофи прийнято класифікувати за типом гниття, що базується на відмінностях у первинній активності лігноцелюлозних ферментів. Загалом, розрізняють три типи розкладу деревини: біла, бура та м'яка гниль [20], але останній не характерний для більшості базидієвих грибів, тоді як перший найпоширеніший у природі та найчастіше застосовується у біотехнології [31].

Гриби білої гнилі (від англ. White-rot fungi) використовують лігнін, целюлозу та геміцелюлозу як субстрат [32]. У цій групі грибів присутні представники родів, що здійснюють селективне розкладання лігнінцелюлозної біомаси: *Ceriporiopsis* (*Gelatoporia*), *Phellinus*, *Phlebia* [31], *Dichomitus*, *Phanerochaete* [32], *Irpex* [33], *Stereum* [34], *Obba* [35], *Lentinus*, *Pycnoporus*, *Crinipellis*, *Pleurotus*, *Inonotus* [36], *Myrothecium*, *Daedalea* [37]. До одночасного розкладання лігніну, целюлози і геміцелюлози здатні *Trametes* (*Coriolus*), *Fomes* [32], *Rigidoporous* [11]. Проте для *Trametes* руйнування лігніну проходить набагато легше, ніж полісахаридів [38]. Різні види серед *Ganoderma* і *Heterobasidion* (*Heterobasidium*) здатні до обох типів деструкції [39], деякі автори повідомляють, що *Trametes* може селективно розкласти лігнін [17, 20].

Види, що включені до родів *Trametes* та *Pleurotus*, є одними з найбільш використовуваних у біотехнологічних дослідженнях завдяки медичним властивостям їх плодових тіл та комерційно цінних метаболітів. Крім того, вони характеризуються високими швидкостями росту та синтезу низки біологічно активних сполук, що привертає увагу вчених [24, 25].

1.2. Ферменти базидієвих макроміцетів

Деструкція деревних полімерів відбувається внаслідок активності екзоферментів. Складна просторова структура лігніну потребує низки окисних ферментів, тоді як для розкладу целюлози необхідна активність гідролаз [42]. В процесі еволюції макроміцети білої гнилі набули здатності до синтезу обох типів ферментів [43], внаслідок чого вони можуть застосовувати феноли для отримання енергії, а вуглеводи – як основні джерела вуглецю [44].

Ферменти, які руйнують клітинні стінки рослин, поділяються залежно від типу полімеру, який вони можуть руйнувати. В основному, система лігноцелюлолітичних ферментів складається з оксидаз, зокрема, лаккази, лігнінпероксидази та манганзалежної пероксидази, які виступають синергістами при руйнуванні лігніну [45]. Розкладання полісахаридів

здійснюється ендо- та екзоглюканазами, β -глюкозидазами, целобіодегідрогеназами, ксилозидазами, галактозидазами тощо [27, 28]. Основні ферменти, що беруть участь у розкладанні поліфенолів та вуглеводів серед макроміцетів *Trametes* і *Pleurotus* представлені у табл. 1.1.

Таблиця 1.1. Основні лігноцелюлолітичні ферменти дереворуйнівних макроміцетів

Фермент		Субстрати	Продукти	Організм	Джерело
Назва	Шифр				
1	2	3	4	5	6
<i>Оксидоредуктази</i>					
Арил-алкоголь-оксидаза	1.1.3.7	Ароматичні первинні спирти, O ₂	Ароматичні альдегіди, H ₂ O ₂	T, P	[47]
Лакказа	1.10.3.2	Бензендіол, O ₂	Бензосеміхінон, H ₂ O	T, P	[48]
Манган-пероксидаза	1.11.1.13	Mn ²⁺ , H ₂ O ₂	Mn ³⁺ , H ₂ O	T, P	[49]
Лігнін-пероксидаза	1.11.1.14	Лігнін/лігнін-подібні сполуки, H ₂ O ₂	Окиснені сполуки, H ₂ O	T, P	[50]
Універсальна пероксидаза	1.11.1.16	Mn ²⁺ , нефенольні сполуки з високим ОВ-потенціалом, H ₂ O ₂	Mn ³⁺ , окиснені нефенольні сполуки, H ₂ O	P	[51]
Літичні полісахаридмоно-оксигенази	1.14.99.54	Лігнін-целюлоза, O ₂ /H ₂ O ₂	Альдолактони/кетоальдоза, H ₂ O	T, P	[52]

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5	6
<i>Гідролази</i>					
Естерази	3.1.1.-	Ксилан, H ₂ O	Похідні ксилану, низькомолекулярна сполука (кислоти, феноли тощо)	Т, Р	[53]
Геміцелюлаза					
-ендоксиланаза	3.2.1.8	Ксилан, H ₂ O	Ксилоолігосахариди	Т, Р	[54]
-арабінофуранозидаза	3.2.1.55				
-ксилозидаза	3.2.1.37	Ксилобіоза, H ₂ O	Ксилоза		
Целюлаза					
-ендоглюканаза	3.2.1.4	Целюлоза, H ₂ O	Целобіоза;	Т, Р	[55]
-екзоглюканаза	3.2.1.74				
-β-глюкозидаза	3.2.1.21	Целобіоза, H ₂ O	Глюкоза		

Примітки: Т – *Trametes* spp, Р – *Pleurotus* spp.

1.2.1. Целюлаза

Целюлази – родина гідролаз, що здійснює каталітичне розщеплення целюлози. Целюлазний комплекс складається з ендо- та екзоглюканази, целобіогідролази, β-глюкозидази [56]. Глюканази гідролізують β-1,4-глікозидні зв'язки, в результаті чого утворюються молекули целобіози, яка піддається розщепленню β-глюкозидазою з утворенням двох молекул глюкози. Такий підхід дозволяє руйнувати важкодоступні зв'язки в молекулах целюлози [56,57]. Розділяють два типи екзоглюканаз ЕзГ1 і ЕзГ2, які відмінні за механізмом розщеплення: перший активний з боку відновних кінців вуглеводу, тоді як другий – невідновних. Для ендоглюканаз характерний випадковий каталіз всередині ланцюгів [8].

Оптимальними субстратами для більшості целюлаз є карбоксиметилцелюлоза, аморфна і кристалічна целюлоза, олігомери, що виникають при розкладанні цих сполук [58]. Тому целюлаза є необхідним ферментом для підвищення ефективності перетворення лігноцелюлози [59].

1.2.2. Лакказа

Лаккази – це полімідні N-глікозильовані оксидоредуктази [60], що здатні до окиснення різних фенольних та нефенольних сполук [44]. Каталітичний центр містить 4 атоми міді, які зв'язуються з різними амінокислотами і розміщені у трьох редокс-центрах [61]. Окиснення субстрату є триступневим процесом, в результаті проходження якого фенольні сполуки, внаслідок втрати одного електрону, можуть полімеризуватися або деполімеризуватися [62].

Лаккази здатні до неселективної ферментативної активності, тому вони окиснюють різного роду субстрати, в першу чергу фенольних молекул [63], в результаті чого утворюються нестабільні фенольні радикали, що окиснюють алкіл-арильні зв'язки [64]. Найчастіше лакказа здійснює каталіз дифенолів (орто- і пара-) та їх похідних (амінофенолів, метоксифенолів), поліфенолів, деяких амінів (поліамінів, аліфатичних амінів) та неорганічних сполук (галогенопохідних, ціанідів, гідроксидів, азидів, йонів купруму та інші), проте низькомолекулярні неорганічні речовини інгібують подальше з'єднання [48, 49].

В деяких випадках лакказа не здатна до прямого окиснення субстрату. Перш за все це пояснюється великою різницею у значеннях окисно-відновного потенціалу субстрату та каталітичного центру [67] або великим розміром сполуки, яка піддається перетворенню [68]. Тому до реакції включається хімічний посередник (медіатор), який виконує роль містка для електронів і діє як проміжний субстрат [63]. Такими медіаторами виступають низькомолекулярні ароматичні сполуки, наприклад, 3-гідроксиантронілова кислота і похідні бензотріазолу. Вони дозволяють здійснювати каталітичний розклад нефенольних сполук, а також полегшують розклад лігніну [31].

1.2.3. Манганзалежна пероксидаза

МП – це гемовмісні екстрацелюлярні протеїни родини оксидоредуктаз. Зазвичай, вони є ключовими ферментами для деструкції лігніну. Окрім йонів заліза, активний центр містить йони Ca^{2+} , що зв'язані з амінокислотами через атоми сульфуру [69]. Каталіз ініціюється тривалентним іоном заліза та молекулою H_2O_2 , хелатований комплекс двовалентного мангану окиснюється і виступає посередником перенесення заряду [70].

Завдяки наявності даного механізму перенесення зарядів МП здатна каталізувати перетворення широко спектру сполук. Субстратами виступають різні ароматичні сполуки, перш за все, лігнін. Крім того, розкладанню можуть піддаватися інші феноли: аміни, барвники тощо [71]. МП може проявляти властивості оксидаз, використовуючи як донор електронів пероксид водню та використання медіаторів з тійльними або ліпідними радикалами [72]. Іншими медіаторами є вільні радикали органічних кислот (оцтової, щавлевої, яблучної, мурашиної), супероксиди тощо, що також роблять доступним здійснення реакції за відсутності молекул пероксиду водню. Це дозволяє їм перетворювати і нефенольні сполуки, зокрема, поліциклічні ароматичні вуглеводні, лігнін-подібні молекули [73]. Також існують відомості про окиснення геміцелюлози, целюлози, хлорофенолів чи антибіотиків МП [74].

1.2.4. Лігнінпероксидаза

ЛП (також відомий як лігніназа) – фермент, що належить до гемовмісних глікопротеїдів олігоманнозного типу та просторово організовані у вигляді спіралі [6]. Окиснення субстратів багатоступеневе і в результаті цих реакцій утворюється ряд проміжних хімічно-активних продуктів – феноксирадикалів, які можуть вступати в реакції полімеризації, ізомеризації, сполучення тощо [75].

ЛП, на відміну від лакказ, характеризуються високим окисно-відновним потенціалом, що дозволяє здійснювати прямий каталіз сполук, розщеплення яких ускладнюється через їх значення окисно-відновного потенціалу.

Внаслідок цього ЛП є важливою системою розкладання лігніну [9]. Вільнорадикальний механізм каталізу позитивно впливає на розщеплення важкодоступних частин лігніну. Цей фермент каталізує розщеплення карбонових зв'язків бічних ланцюгів лігніну, гідроксилує метиленові групи, окиснює спирти до відповідних сполук (альдегідів чи кетонів), а також може розщеплювати ароматичні кільця [76].

1.2.5. Тирозиназа

Тирозиназа (монофенол, о-дифенол:оксиген оксидоредуктаза) – мідьвмісний протеїни оксидазного типу, що залучені до синтезу пігментів – меланінів [77]. Вона містить шість залишків гістидину, з'єднаних із двома іонами міді в активному центрі [78].

Хоча тирозиназа не залучена до деструкції лігніну напряму, проте монофенольні сполуки його розкладу виступають субстратами для її активності [79]. Тирозинази можуть каталізувати низькомолекулярні доступні фенольні сполуки, наприклад, тирозинові залишки протеїнів, о-хінони чи інші. Це біфункціональні ферменти, що діють як монофенолоксидаза і катехолоксидаза. Фенолазна активність тирозинази відображається у гідроксилуванні монофенолів у орто-положенні, тоді як дифенолазна – окисненні орто-дифенолів до хімічно активних хінонів [80]. Обидві реакції проходять за наявності O_2 . Крім того, тирозиназа здатна взаємодіяти не тільки з монофенолами, але й поліфенолами, зшивати утворені молекули хінону із гістидиновими, цистеїновими, лізиновими та іншими залишками протеїнових молекул [78].

1.3. Методи отримання лігноцелюлозних ферментів

Для культивування базидієвих макроміцетів з метою отримання ферментів часто застосовуються відходи сільськогосподарських виробництв, завдяки високій рентабельності та кінцевому виходу продукту [14]. Більшість з цих відходів складає лігноцелюлоза, яка розглядається як дешеве джерело

поживних сполук. Основою лігноцелюлозних залишків є лушпиння насіння, жом цукрової тростини, яблучні та виноградні вичавки, стебла рослин і деревна тирса тощо [81]. Крім того, лігноцелюлоза містить ряд фенольних сполук, включаючи фенольні кислоти (2,5-ксилідин, ферулову кислоту, 3-гідроксиантранілат), які можуть слугувати індукторами лігноцелюлолітичних ферментів [82].

1.3.1. Твердофазне культивування

Культивування базидієвих макроміцетів на твердих промислових відходах є типовим методом отримання біомаси та комерційно-важливих продуктів [83]. Основною перевагою такого підходу є схожість із природним процесом колонізації деревної біомаси, меншим використанням хімічних сполук і води, проте виникає складність при контролі накопичення продукту, споживанні субстрату і відділенні біомаси по завершенню процесу [84]. Найчастіше субстратами для твердофазного культивування виступають залишки:

- зернових культур (риса, жита, вівса, пшеницю, кукурудзи, соняшника, сої тощо);
- харчової промисловості (вичавки, висівки, макуха, олія, жом, лушпиння, шкарлупа, шкірки) [66, 70];
- целюлозно-паперової промисловості (макулатура) [86];
- деревообробної (деревна стружка) тощо [87].

Цей підхід часто використовується не тільки для отримання біомаси, але й з метою продукування ферментів. Узагальнена інформація про індукцію ферментів представлена у табл. 1.2.

Таблиця 1.2. Твердофазне культивування з метою отримання ферментів

Фермент	Тип відходів	Продуцент	Кількість ферменту, од/л (*од/г субстрату)	Джерело
Целюлаза	Пшенична солома	Р _о	0,7-1,2	[88]
	Листя дерев	Р _о	0,014-0,015	
	Стружка евкалиптова	Т _v	0,8-4,0*	[89]
Лакказа	Листя дерев	Р _о	6,3-8,0	[88]
	Пшенична солома	Р _о	7-12	
	Пшеничні висівки	Р _о	9210	[90]
		Т _v	17860	
	Кукурудзяний силос	Т _v	1539,4	[91]
	Томатні вичавки	Т _v	35*	[92]
		Р _о	15*	
Картопляне лушпиння	Р _о	6708.3	[93]	
Манган-пероксидаза	Листя дерев	Р _о	1,0-6,7	[88]
	Кукурудзяний силос	Т _v	209,1	[91]
	Картопляне лушпиння	Р _о	2503,6	[93]
Лігнін-пероксидаза	Відходи ятрофи	Р _о	49916	[94]
	Картопляне лушпиння	Р _о	231,9	[93]

1.3.2. Глибинне культивування

Попри значні досягнення у методах твердофазного культивування, ведуться пошуки нових методів для більш ефективного та конкурентоспроможного виробництва ферментів [95]. Спосіб культивування значною мірою впливає на ріст міцелію і продуктивність ферментів [57]. Глибинне культивування особливо популярне для культивування

мікроорганізмів і в останні роки набуває поширення при культивуванні макроміцетів. При цьому типі застосовуються рідкі поживні середовища, в яких суспендовано нутрієнти [96]. Це підвищує їх доступність, забезпечує однорідність умов культивування та хімічного складу, крім того, зростає доступність кисню, який необхідний для здійснення окисних процесів [97].

Промислові відходи також використовуються при глибинному культивуванні макроміцетів. В такому випадку їх додають до рідких поживних середовищ як основне або додаткове джерело карбону, чи індуктора для синтезу специфічних ферментів. Дані, що стосуються ферментативної активності в глибинній культурі при додаванні лігноцелюлозних відходів представлено у табл. 1.3.

Таблиця 1.3. Глибинне культивування з метою отримання ферментів

Фермент	Тип відходів	Продуцент	Кількість ферменту, од/л	Джерело
1	2	3	4	5
Целюлаза	Мандаринові шкірки	Po	0,016	[98]
		Tv	0,012	
	Яблучні вичавки	Po	0,022	
		Tv	0,025	
	Персикові вичавки	Po	0,029	
		Tv	0,030	
	Листя кедр	Po	0,026	
		Tv	0,003	
Лакказа	Мандаринові шкірки	Po	8,340	[99]
		Tv	15860	
		Tv	17140-20360	
	Яблучні вичавки	Po	1040	[98]
		Tv	4590	
	Персикові вичавки	Po	1720	
		Tv	5590	

Продовження таблиці 1.3

1	2	3	4	5
Лакказа	Листя кедрa	Po	520	[98]
		Tv	5440	
	Насіння винограду	Tv	2,9	[100]
	Стебла винограду	Tv	3,3	
	Ячмінні висівки	Tv	1,2	
	Ячмінна солома	Tv	2,2	
	Пшеничні висівки	Tv	460-19020	[99]
	Тирса дуба	Tv	6,69	[7]
	Тирса каштана	Tv	4,97	
	Стічні води паперової промисловості	Tv	372	
Жом цукрової тростини	Tv	220	[101]	
Манган-пероксидаза	Мандаринові шкірки	Po	30	[98]
		Tv	50	
		Tv	60-710	[99]
	Яблучні вичавки	Po	-	[98]
		Tv	20	
	Персикові вичавки	Po	-	
		Tv	-	
	Листя кедрa	Po	40	
Tv		20		
Пшеничні висівки	Tv	0-1200	[99]	
Жом цукрової тростини	Tv	610	[101]	
Лігнін-пероксидаза	Tv	280		

Примітки: - – ферментативна активність відсутня

Попередньо оброблені промислові відходи ефективніше утилізуються грибами, що пов'язано із кращою доступністю поживних сполук. Зокрема, після парової обробки кукурудзяних стебел синтез лаккази зростає до 2600 од/г сухої маси [102]. Водночас гідролізати лігноцелюлозного матеріалу

містять фуральдегіди (фурфурол, гідроксиметил-2-фуральдегід), флаваноїди (дигідрокверцетин, катехіни, таніни), органічні кислоти (оцтову, мурашину, левунілову тощо), фенольні сполуки (ванілін, сириновий і коніфериловий альдегід, похідні бензойної кислоти), смолові кислоти (абіетинову кислоту та її похідні) [90, 91]. На деревообробних підприємствах утворюється велика кількість пресової води, яка негативно впливає на водні екосистеми, саме через наявність фенольних та поліфенольних речовин [105].

Саме це привело до початку досліджень використання гідролізатів деревини для глибинного культивування макроміцетів [82]. Рерке та ін. застосовували стічні води деревообробної промисловості для культивування лігноцелюлолітичного мікроміцету *Trichoderma reesei*. Було встановлено, що такий індуктор значно інтенсифікує глюканазну та ксиланазну активність. Проте автори не досліджували вплив фенольних сполук, що містяться у воді, на синтез окисних ферментів [104]. Bertrand та ін. вивчали індукційні ефекти додавання водних екстрактів тирси різних листяних та хвойних порід дерев до рідкого поживного середовища. Дослідники встановили, що навіть невеликі кількості екстрактів позитивно впливають на ріст та синтез лаккази [82]. Daugulis і Bone встановили позитивний вплив екстрактів кори клену і кедру на целюлазну активність *Pleurotus sapidus*, *Pbanerochaete cbryosporium* і *Polyporus anceps* в умовах глибинного культивування [106]. Крім того, у випадку застосування рослинних гідролізатів для розчинення всіх компонентів середовища, ведуться дослідження тільки у поверхневій культурі на чашках Петрі, тому вивчення ферментативної активності не проводилось [106].

1.4. Застосування лігноцелюлолітичних ферментів для знебарвлення барвників

Використання синтетичних барвників стає все більш поширеним. Наразі вони застосовуються у текстильній, косметичній, фармацевтичній, харчовій та інших сферах промисловості [107]. Водночас вони є токсикогенними і

мутагенними агентами, тому ведуться пошуки ефективних засобів їх видалення, в тому числі з використанням сполук базидієвих макроміцетів [108].

Дослідження знебарвлення барвників охоплює різні типи цих сполук, зокрема, гетероциклічні, індигоїдні, трифенілметанові, азобарвники, триазинові та інші [109]. Знебарвлення синтетичних барвників було проведено з використанням суспензій гіфів, неочищених та очищених ферментів. Перспективами використання ферментів є вища стабільність цього продукту та швидший час деструкції, порівняно із ростом базидієвих макроміцетів [110].

Узагальнена інформація щодо деколоризації типових барвників ферментами макроміцетів представлена у табл. 1.4.

Таблиця 1.4. Ступінь знебарвлення деяких барвників ферментними системами *Pleurotus* і *Trametes*.

Барвник	Відсоток знебарвлення	Тип ферменту	Організм	Джерело
МС	90	Н	Tv	[111]
Азофлорксин	14,4	Н	Tv	[112]
МЗ	92	О	Tv	[113]
Бромтимоловий синій	82	О	Tv	
Метилловий червоний	50	О	Tv	
Реактивний блакитний	52-85	О	Tv	[114]
Кислотний фіолетовий	100	О	Tv	
Кислотний червоний	45-55	О	Tv	
SN4R	85	Н	Po	[115]

Примітки: Н – неочищений фермент; О – очищений фермент.

Деколоризація барвників найчастіше здійснюється лакказою, що було продемонстровано із використанням очищених та неочищених ферментів *T.*

trogii. Синергістами при деструкції виступають пероксидази, крім того, у деяких видів вони відіграють переважну роль при деколоризації [116]. Активність знебарвлення також залежить від типу барвника, наприклад, антрахінонові барвники деградують швидше, ніж азосполуки [110].

Таким чином, для дослідження буде доцільно обрати по одному виду *Trametes* та *Pleurotus*, а саме *T. versicolor* і *P. ostreatus*, які, за даними літератури, є активними продуцентами низки лігноцелюлозних ферментів. Оптимальним методом індукування їх синтезу є додавання фенольних сполук. Зокрема поліфеноли та поліциклічні сполуки, наприклад, лігноцелюлоза або її похідні, можуть бути використані з цією метою. На основі огляду літератури можна зробити висновок про те, що використання гідролізатів або екстрактів лігноцелюлозних залишків для культивування макроміцетів є недостатньо вивченим та потребує досліджень, зокрема отримання гідролітичних та окисних ферментів з використанням глибинного культивування на середовищах, що містять відповідні екстракти. Також можна констатувати, що застосування ферментних систем у знебарвленні синтетичних сполук, особливо барвників, є досить поширеним. Проте у літературі не достатньо інформації присвяченої використанню для цього неочищених ферментів, в тому числі *T. versicolor* і *P. ostreatus*, тобто культуральної рідини, в якій вони містяться. Крім того, було б доцільно дослідити й інші барвники, які теж часто застосовуються у промисловості.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1.1. Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження були 2 види (7 штамів) відділу *Basidiomycota* (табл. 2.1), що характеризуються як продуценти біологічно активних сполук та зберігаються у Національній колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК)* і Музеї кафедри промислової біотехнології (ФБТ, КПІ)** [117].

Таблиця 2.1. Список досліджуваних культур базидієвих макроміцетів

Вид	Номер штаму в колекції	Скорочення, використане у роботі
Клас <i>Agaricomycetes</i> Порядок <i>Agaricales</i> Родина <i>Pleurotaceae</i>		
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr.) P. Kumm.**	8	Po8
	12	Po12
Клас <i>Basidiomycetes</i> Порядок <i>Poriales</i> Родина <i>Coriolaceae</i>		
<i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd*	353	Tv353
	1689	Tv1689
	5094	Tv5094
	5095	Tv5095
	5299	Tv5299

Всі штами зберігаються за температури (5 ± 1) °C на агаризованому пивному суслі (4° за Баллінгом) і пересіваються щороку для перевірки чистоти культури та запобігання пересиханню.

2.1.2. Приготування екстрактів тирси деревини

Для дослідження росту та синтезу біологічно активних сполук використано тирсу 4-х представників дерев'янистих рослин надпорядку *Rosanae*, порядків *Malpighiale* – осики (родина *Salicaceae*, рід *Populus* L.) та *Fagales* – берези (родина *Betulaceae*, рід *Betula* L.), бука (родина *Fagaceae*, рід *Fagus* L.), дуба (родина *Fagaceae*, рід *Quercus* L.) [118].

Тирсу дерев, розміром 5 мм × 10 мм, поміщали у круглі плоскодонні колби, заливали водопровідною водою у співвідношенні 20:1, колби закривали марлевою пробкою та автоклаували за 1 атм упродовж 20 хв [119]. Після повного охолодження тирсу відділяли шляхом фільтрування через марлевий фільтр. Отриманий фільтрат додатково фільтрували через паперовий фільтр найменшої щільності (13-25 мкм). Отримані, двічі профільтровані, екстракти використовували у дослідженні.

2.1.3. Поживні середовища та їх приготування

В ході експериментів були використані 11 видів середовищ (табл. 2.2).

Таблиця 2.2. Список поживних середовищ

Середовище	Склад		рН	Призначення
	Компоненти	Розчинник		
1	2	3	4	5
Агаризоване пивне сусло (СА)	Пивне сусло – 333 см ³ , Агар-агар – 15 г	Дистильована вода – 1 дм ³	7,0	Для відновлення музейної культури та вирощування посівного матеріалу
Агаризоване середовище Норкранс (СНА-К)	Сольова основа*, Агар-агар – 15 г	Дистильована вода – 1 дм ³	6,8	Для досліду №1

Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4	5
Агаризоване середовище Норкранс на основі екстракту берези (СНА-Бр)	Сольова основа, Агар-агар – 15 г	Екстракт тирси берези – 1 дм ³	6,8	Для дослідів №1
Агаризоване середовище Норкранс на основі екстракту осики (СНА-О)		Екстракт тирси осики – 1 дм ³		
Агаризоване середовище Норкранс на основі екстракту бука (СНА-Бк)		Екстракт тирси бука – 1 дм ³		
Агаризоване середовище Норкранс на основі екстракту дуба (СНА-Д)		Екстракт тирси дуба – 1 дм ³		
Середовище Норкранс (СН-К)	Сольова основа	Дистильована вода – 1 дм ³	6,8	Для отримання посівного матеріалу та дослідів №2, №3
Середовище Норкранс на основі екстракту берези (СН-Бр)		Екстракт тирси берези – 1 дм ³		Для дослідів №2 та №3
Середовище Норкранс на основі екстракту бука (СН-Бк)		Екстракти тирси бука – 1 дм ³		

Кінець таблиці 2.2

1	2	3	4	5
Середовище Норкранс на основі екстракту дуба (СН-Д)	Сольова основа	Екстракти тирси дуба – 1 дм ³	6,8	Для дослідів №2 та №3

Примітки: *сольова основа – компоненти середовищ (у г/дм³): глюкоза – 10; NH₄NO₃ – 1, KH₂PO₄ – 1, MgSO₄·7H₂O – 0,5, FeSO₄·7H₂O – 0,005, ZnSO₄·7H₂O – 0,0044, CaCl₂ – 0,0055 [120].

Стерилізацію поживних середовищ проводили за загальноприйнятими методами. У випадку рідких поживних середовищ джерело вуглецю (глюкозу) стерилізували окремо від інших компонентів. Для цього використовували розчин глюкози концентрацією 50 %. Стерильний розчин глюкози асептично вносили у колбу із середовищем із розрахунку до вказаної концентрації [120].

2.1.4. Умови культивування

Поверхнєве культивування на агаризованих поживних середовищах

Міцелій культивували на чашках Петрі за температури (28 ± 1) °С в термостаті до повного обростання чашок. Як інокулюм використовували диски міцелію діаметром 5 мм, які вирізали стерильною металевою трубкою на відстані 1 см від краю колонії, вирощеної на СА та поміщали на чашку Петрі [120].

Поверхнєве культивування на рідких поживних середовищах

Міцелій культивували у колбах Ерленмеєра об'ємом 250 см³ із 50 см³ поживного середовища в термостаті за температури (28 ± 1) °С упродовж 21 доби. Як інокулюм використовували 5 дисків міцелію, отриманих як зазначено вище [121].

Глибинне культивування з метою отримання посівного матеріалу

Міцелій культивували у колбах Ерленмеєра об'ємом 250 см³ із 50 см³ поживного середовища (СН-К) за температури (28 ± 1) °С на лабораторних

качалках (150 об/хв) упродовж 7 діб. Як інокулюм використовували 5 дисків міцелію, отриманих як зазначено вище [122].

Глибинне культивування для досліджень

Міцелій культивували у колбах Ерленмеєра об'ємом 250 см³ із 45 см³ досліджуваного поживного середовища в термостаті за температури (28 ± 1) °С на лабораторних качалках (150 об/хв) упродовж 14 діб. Інокулюм вносили у кількості 5 см³ [82].

2.1.5. Дослідження росту макроміцетів за різних умов культивування

При культивуванні на чашках Петрі вимірювали радіуси колонії в чотирьох взаємоперпендикулярних напрямках щоденно. Після побудови кривих росту грибів визначали швидкість радіального росту у фазі лінійного росту:

$$V_R = \frac{R_2 - R_1}{\Delta t}, \quad (2.1)$$

де R – радіус колонії в кінці (R_2) та на початку (R_1) фази лінійного росту, мм; Δt – тривалість фази лінійного росту, діб.

Ростовий коефіцієнт визначали за формулою:

$$PK = \frac{D \cdot H \cdot G}{T}, \quad (2.2)$$

де D – діаметр колонії, мм; H – висота колонії, мм; G – щільність колонії, балів, T – вік колонії, діб [123].

Після культивування у колбах біомасу відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування через нейлоновий фільтр. Визначення кількості біомаси проводили ваговим методом. Концентрацію абсолютно сухої біомаси (C_{ACB}) приймали як приріст біомаси у процесі культивування (в грамах на 1 дм³ поживного середовища) і розраховували за формулою:

$$C_{ACB} = \frac{\Delta m_{ACB}}{V}, \quad (2.3)$$

де Δm_{ACB} – приріст АСБ в ході культивування, г; V – об'єм культуральної рідини, дм^3 [124].

2.1.6. Визначення основних аналітичних показників

Активну кислотність (рН) визначали потенціометрично за допомогою рН-метра-мілівольтметра .

Кількість сухих речовин (СР) визначали ваговим методом. Концентрацію СР (C_{CP}) розраховували як масу в грамах на 1 дм^3 поживного середовища за формулою:

$$C_{CP} = \frac{m_{CP+B} - m_B}{V}, \quad (2.4)$$

де m_{CP+B} – маса сухих речовин разом із бюксом, г; m_B – маса бюкса, г; V – об'єм культурального фільтрату, дм^3 [120].

Кількість редукуючих речовин (РР) визначали спектрофотометрично модифікованим методом Хагедорна-Йенсена [120]. Вміст РР (C_{PP}) розраховували за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами глюкози в діапазоні концентрацій $20\text{-}150 \text{ мкг/см}^3$ за формулою (2.5).

Кількість протеїнів у культуральній рідині визначали спектрофотометрично методом Лоурі [125]. Вміст протеїнів ($C_{\text{протеїнів}}$) розраховували за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами курячого альбуміну в діапазоні концентрацій $0\text{-}500 \text{ мкг/см}^3$ за формулою (2.5).

Кількість фенольних сполук (ФС) у культуральній рідині визначали спектрофотометрично, використовуючи розчин Фоліна-Чокальтеу [126]. Вміст ФС розраховували за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами тимолу в діапазоні концентрацій $50\text{-}450 \text{ мкг/см}^3$ за формулою (2.5).

Формула розрахунку сполук за калібрувальним графіком:

$$C_{\text{речовини}} = C_{\text{речовини}}^{KG} \cdot b, \quad (2.5)$$

де $C_{\text{речовини}}^{KG}$ - концентрація речовини (глюкози, протеїнів, тимолау) за калібрувальним графіком, г/дм³; b – фактор розведення.

2.1.7. Визначення ферментативної активності

При поверхневому культивуванні на агаризованих середовищах синтез ферментів-оксидаз визначали якісно. Для цього на міцелій на останній день культивування наносили краплю відповідного реактиву та фіксували зміну забарвлення міцелію та середовища через 1440 хв.

Лакказну активність визначали за допомогою розчину α -нафтолу [120].

Пероксидазну активність визначали за допомогою суміші розчинів 1% пірогалолу та 0,4% H₂O₂ [120].

Тирозиназну активність визначали за допомогою розчину p -крезолу [120].

В ході культивування на рідких середовищах визначали ферментативну активність (ФА) у культуральному фільтраті за нижченаведеними методами.

Целюлазну активність (ЦА) визначали за методом Гоша. Після цього розраховували кількість РР вищевказаним методом. За одиницю ПЦА (міжнародну одиницю, мо/мг протеїнів) приймали кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль редукуючих речовин з фільтрувального паперу в 1 мл суміші за 1 хв у перерахунку на 1 мг протеїнів у культуральній рідині [127,128].

Карбоксиметилцелюлазну активність (КМЦА) визначали за методом Гоша. Після цього розраховували кількість РР вищевказаним методом. За одиницю ПКМЦА (мо/мг протеїнів) приймали кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль редукуючих речовин з карбоксиметилцелюлози в 1 мл реагуючої суміші за 1 хв у перерахунку на 1 мг протеїнів у культуральній рідині [127,128].

Лакказну активність (ЛА) визначали спектрофотометрично методом Арора та Сендху. За одиницю ПЛА (мо/мг протеїнів) приймали кількість ферменту, що окиснює 1 мкмоль гваяколу за 1 хв у перерахунку на 1 мг протеїнів у культуральній рідині [129].

Тирозиназну активність (ТА) визначали спектрофотометрично методом Женга. За одиницю ПТА (мо/мг протеїнів) приймали кількість ферменту, що окиснює 1 мкмоль тирозину за 1 хв у перерахунку на 1 мг протеїнів у культуральній рідині [130,131].

Манганпероксидазну активність (МПА) визначали спектрофотометрично методом Сукарта. За одиницю ПМПА (од/мг протеїнів) приймали зміну оптичної густини на 0,1 за 1 хв в 1 мл у перерахунку на 1 мг протеїнів у культуральній рідині [132].

Лігнінпероксидазну активність (ЛПА) визначали спектрофотометрично методом Магальянс. За одиницю ПЛПА (ко/мг протеїнів) приймали зміну оптичної густини за 1 хв у перерахунку на 1 мг протеїнів у культуральній рідині [133].

Розрахунок значень питомої ферментативної активності проводили за формулою:

$$ПФА = \frac{\Phi A}{C_{\text{протеїнів}}} . \quad (2.7)$$

2.1.8. Знебарвлення синтетичних барвників

Для дослідження використовували 5 барвників (табл. 2.3). У пробірку вносили 0,8 см³ розчину барвника певної концентрації, 0,99 см³ 0,2М ацетатного буфера (рН 3,5), 0,1 см³ культурального фільтрату, 0,01 см³ дистильованої води. Вміст пробірок витримували за 30 °С упродовж 48 год [109]. Ступінь знебарвлення барвників (СЗБ) визначали як зменшення оптичної густини порівняно з початковим значенням за формулою:

$$СЗБ = \frac{A_{кін}}{A_{поч}} \cdot 100\%, \quad (2.8)$$

де $A_{поч}$ і $A_{кін}$ – початкове і кінцеве значення оптичної густини відповідно.

Таблиця 2.3. Характеристика синтетичних барвників [116]

Назва	Скорочення, прийняте в роботі	Тип барвника	Концентрація, мкМ	λ^* , нм
Метиленовий синій	МС	Гетероциклічний	15	664
Індигокармін	ІК	Індигоїдний	50	609
Малахітовий зелений	МЗ	Трифенілметановий	22	615
Бромфеноловий синій	БФ		40	605
Генціанвіолет	ГВ		14	590

Примітки: * - довжина хвилі, використана при вимірюванні знебарвлення.

2.1.9. Визначення макростехіометричних показників культивування

Для перевірки ефективності перетворення субстрату розраховували наступні показники [134].

Економічний коефіцієнт за редукуючими речовинами (Y_{PP}) розраховували за формулою:

$$Y_{PP} = \frac{C_{ACB}}{C_{PP}^{поч} - C_{PP}^{кін}} \cdot 100\%, \quad (2.9)$$

де $C_{PP}^{поч}$ і $C_{PP}^{кін}$ – початкова і кінцева концентрація редукуючих речовин відповідно, г/дм³.

Економічний коефіцієнт за сухими речовинами (Y_{CP}) розраховували за формулою:

$$Y_{CP} = \frac{C_{ACB}}{C_{CP}^{поч} - C_{CP}^{кін}} \cdot 100\%, \quad (2.10)$$

де $C_{CP}^{поч}$ і $C_{CP}^{кін}$ – початкова і кінцева концентрація сухих речовин відповідно, г/дм³.

Продуктивність синтезу ферментів ($Y_{\Phi A}$) розраховували за формулою:

$$Y_{\Phi A} = \frac{\Phi A}{C_{ACB}^{кін} - C_{ACB}^{поч}}, \quad (2.11)$$

де $C_{ACB}^{поч}$ і $C_{ACB}^{кін}$ – початкова і кінцева концентрація біомаси відповідно, г/дм³.

2.1.10. Статистична обробка результатів

Для отримання статистично достовірних результатів усі виміри повторювали у трьох повторностях. Кількісні результати, отримані в ході роботи, обробляли статистичними методами аналізу. У результатах представлено дані у вигляді ($M \pm m$), де M – середнє значення величини, m – стандартне відхилення величини. Достовірність результатів оцінювали за допомогою тесту ANOVA і порівнювали із значеннями для контрольного середовища, які приймали за контроль. Статистично достовірними вважали результати зі значеннями: * (a) – $p\text{-value} < 0,05$, ** (b) – $p\text{-value} < 0,01$, *** (c) – $p\text{-value} < 0,001$. Розрахунок усіх показників та побудову графіків, гістограм проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft office Excel (США) [135].

Наявність лінійних залежностей між показниками визначали за методикою, наведеною у [136].

2.2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

2.2.1. Дослідження впливу екстрактів тирси на біотехнологічні характеристики макроміцетів у поверхневій культурі

Проведення досліджень складу поживного середовища є необхідним кроком для розуміння біологічних особливостей макроміцетів, що дозволяє регулювати накопичення біомаси чи продуктивність синтезу метаболітів. Кількісний аналіз впливу поживних середовищ на ріст макроміцетів дає можливість обрати найбільш оптимальні варіанти для подальших досліджень. Тому було проведено скринінг поживних середовищ на основі екстрактів тирси деревних порід: осики, берези, дуба та бука. Результати порівнювали із контрольним середовищем, яке містило дистильовану воду.

Результати швидкості радіального росту, представлені на рис. 2.1, розраховували на основі даних динаміки росту (Додаток А).

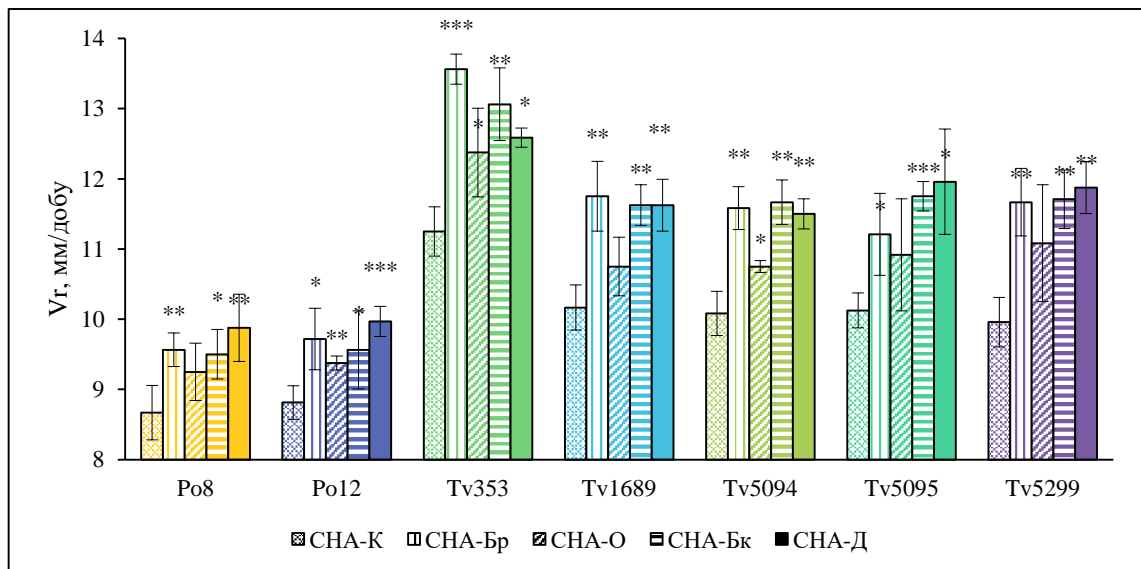


Рис. 2.1. Швидкість радіального росту міцелію досліджуваних дереворуйнівних макроміцетів

Згідно з рис. 2.1. культивування макроміцетів на середовищах із додаванням екстракту тирси берези зумовлювало отримання максимальних значень V_r . Досліджувані штами *T. versicolor* мають більшу швидкість росту, ніж *P. ostreatus*. Порівнюючи ріст штамів представлених видів на CHA-K,

можна констатувати, що Tv353 мав найвище серед усіх значення V_r – $(11,3 \pm 0,4)$ мм/добу, тоді як для інших штамів цього виду значення V_r дорівнювало 9,6 – 10,3 мм/добу, а *Pleurotus* – 8,3 – 9,1 мм/добу.

Найбільше значення цього показника спостерігалось у випадку Tv353 – $(13,6 \pm 0,2)$ мм/добу, що у 1,2 рази більше, ніж на контрольному середовищі. Додавання екстракту осики до агаризованого середовища Норкранс не збільшувало швидкість росту у випадку Po8, Tv1689, Tv5094 і Tv5299, тоді як для інших штамів ріст збільшувався і був найбільш значущим при культивуванні Po12, де V_r дорівнювало $(9,7 \pm 0,1)$ мм/добу (+ 6,4 % відносно контрольного значення). У еквівалентні приросту найбільше значення швидкості росту при додаванні екстракту тирси бука і дуба спостерігалось для штаму Tv5299 і становило 11,7 мм/добу та 11,9 мм/добу.

Швидкість росту не завжди є об'єктивним показником придатності середовища для росту, оскільки він не враховує кількість міцелію. Тому заведено використовувати ростовий коефіцієнт, на значення якого впливають діаметр, висота і щільність колонії (Додаток А). За розрахованими значеннями ростового коефіцієнта побудовано діаграму, представлену на рис. 2.2.

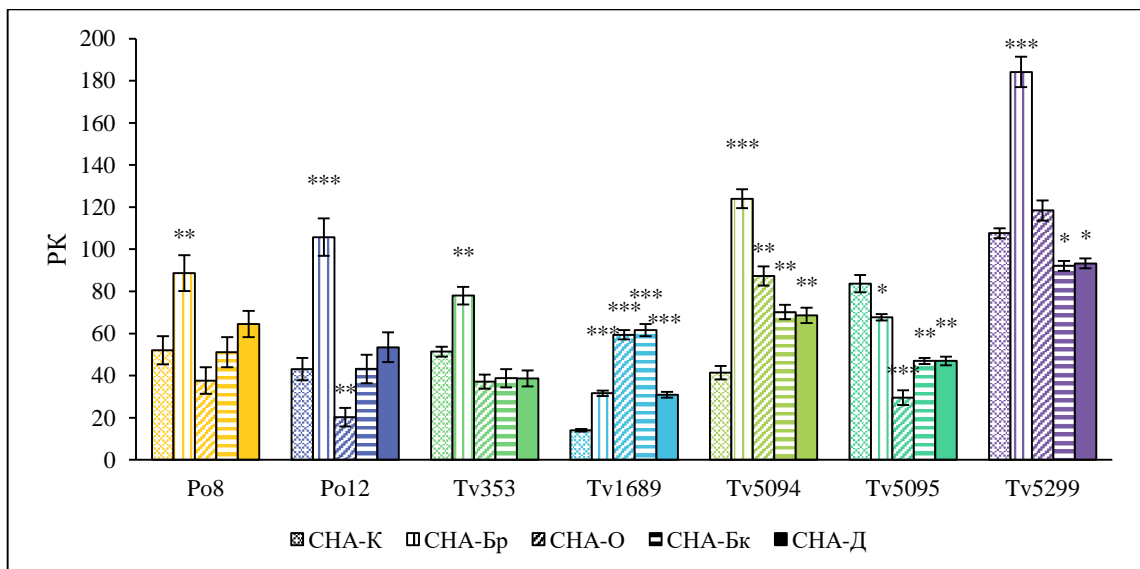


Рис. 2.2. Ростовой коэффициент мицелия досліджуваних дереворуйнівних макроміцетів

Як видно з рис. 2.2 більші значення РК при культивуванні на всіх середовищах спостерігалося для штаму Tv5299: 88,3 – 198,6 (з максимальним значенням для СНА-Бр). Ростовий коефіцієнт на середовищі з додаванням екстракту тирси берези був найбільшим для п'яти з семи досліджуваних штамів: Po8 ($88,7 \pm 8,5$), Po12 ($105,8 \pm 8,9$), Tv353 ($78,0 \pm 4,2$), Tv5094 ($124,0 \pm 4,5$) і Tv5299 ($184,2 \pm 7,2$); при культивуванні Tv1689 найбільший РК був на середовищах СНА-О і СНА-Бк ($59,4 \pm 2,2$ і $61,6 \pm 2,9$ відповідно), тоді як у випадку Tv5095 максимальне значення РК фіксували при культивуванні на контрольному середовищі ($83,7 \pm 4,1$). Для екстрактів тирси бука та дуба спостерігали однакові значення ростового коефіцієнта для всіх штамів, крім Tv1689.

По завершенню культивування якісно визначали ферментативну активність. Результати представлені в табл. 2.4.

Таблиця 2.4. Ферментативна активність досліджуваних штамів на агаризованих поживних середовищах

Об'єкти дослідження	Фермент, що визначався														
	Лакказа					Пероксидаза					Тирозиназа				
	СНА-К	СНА-Бр	СНА-О	СНА-Бк	СНА-Д	СНА-К	СНА-Бр	СНА-О	СНА-Бк	СНА-Д	СНА-К	СНА-Бр	СНА-О	СНА-Бк	СНА-Д
Po8	1	3	1	3	3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Po12	1	3	1	2	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2
Tv353	1	3	1	3	3	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2
Tv1689	1	3	1	3	3	0	0	0	1	2	1	1	1	2	2
Tv5094	1	3	1	2	3	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2
Tv5095	1	3	1	3	3	0	0	0	1	2	0	0	0	2	2
Tv5299	1	1	1	2	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2

Примітки: 0 – реакція відсутня; 1 – реакція слабо виражена; 2 – реакція помірно виражена; 3 – реакція сильно виражена.

Як наведено в табл. 2.4, досліджувані екстракти найбільше інтенсифікували синтез лаккази, що особливо виражено на середовищах із додаванням екстрактів букоцвітих. Менш виражена якісна реакція спостерігалася при дослідженні пероксидазної та тирозиназної активності. Пероксидазна активність на СНА-К, СНА-Бр і СНА-О не спостерігалася. Слід зазначити, що для штамів *P. ostreatus* індукції синтезу тирозинази не фіксувалася на жодному з досліджуваних середовищ, окрім СНА-Д для Р012.

Культивування штамів на середовищах з екстрактами тирси інтенсифікувало ріст міцелію макроміцетів. У випадку *P. ostreatus* ці середовища дали змогу отримати швидкість росту, подібну до росту *T. versicolor* на контрольному середовищі. Вивчення закономірностей росту видів *Trametes*, зокрема штамів, використаних у цьому дослідженні, у поверхневій культурі на агаризованих середовищах уже проводили в Київському політехнічному інституті [137]. Науковці встановили, що натуральні середовища приводять до отримання більших значень швидкості росту штамів 5095, 5131 і 5299. Синтетичне середовище Норкранс було більш сприятливим для росту 353 та 1689, для яких V_r складала $(11,5 \pm 0,4)$ мм/добу та $(10,5 \pm 0,3)$ мм/добу відповідно. У нашому дослідженні спостерігалися подібні значення швидкості радіального росту. Додавання екстрактів тирси приводило до збільшення цього показника, зокрема, у випадку всіх штамів, окрім 5095, він перевищував дані літератури. Вивчення впливу відварів рисових висівок і кукурудзяної крупи на ріст *T. elegans* показує, що такі середовища значно інтенсифікують ріст міцелію (18,2 мм/добу і 17,8 мм/добу відповідно), порівнюючи із картопляно-глюкозним агаром, де ріст становив 16,3 мм/добу. Але в цьому дослідженні було використано інший підхід, в якому дистильована вода замінювалася екстрактами тирси, що інтенсифікувало ріст досліджених *T. versicolor* [138]. Екстракти різних частин деревини по-різному впливають на ріст міцелію макроміцетів. Наприклад, етанол-бензенові екстракти кори сосни інгібують ріст *T. versicolor*, що може бути пов'язано із підвищеною кількістю фенольних сполук [139].

Було проведено культивування *P. ostreatus* на агаризованих середовищах із додаванням різних промислових відходів [140]. Дослідники використали вермикомпост, змив вермикомпосту, рибні залишки і кісткове борошно. У випадку змивної води з вермикомпосту, її використовували як розчинник для картопляно-глюкозного агару і порівнювали зі стандартним картопляно-глюкозним агаром. Було встановлено, що швидкість радіального росту на середовищі порівняння становить 0,017 см/год (4,1 мм/добу), а при використанні змиву збільшувалось на 63,9 % – до 0,028 см/год (6,72 мм/добу). Проте, у цій дисертаційній роботі було використано екстракти тирси як розчинник, а за основу взято середовище Норкранс. Максимальне встановлене збільшення швидкості росту складало + 13,9 % для штаму Ро8. Крім того, досліджуваний показник на контрольному середовищі був значно більший, ніж у роботі Grandes-Blanco.

Змивні води містять велику кількість розчинних поживних сполук, які інтенсифікують ріст (нітроген, фосфор, калій), тоді як екстракти тирси містять ароматичні сполуки, які іншим чином впливають на ріст. Dawidowicz та Siwulski досліджували міцеліальний ріст *P. cystidiosus* на середовищі із додаванням екстракту тирси вільхи та бука, екстракту пшениці, картопляно-глюкозний агар, синтетичному середовищі Hansen і мальтозо-пептоновому середовищі. Вони встановили, що агаризовані середовища з екстрактами тирси та пшениці зумовлювали найбільший ріст [141]. Аналогічним чином екстракти тирси досліджуваних порід деревини, використані в даній роботі, збільшували швидкість росту *P. ostreatus*.

Зважаючи на досліджувані показники можна зробити висновок, що наявність екстрактів тирси позитивно впливає на ріст та ферментативну активність усіх штамів *P. ostreatus* та *T. versicolor*. Проте екстракти букоцвітих більшою мірою інтенсифікували ріст міцелію і синтез ферментів оксидазного типу. Тому для подальших етапів дослідження екстракти тирси осики не використовувалися.

2.2.2. Дослідження впливу екстрактів тирси на біотехнологічні характеристики макроміцетів у стаціонарній культурі

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

2.2.3. Дослідження впливу екстрактів тирси на біотехнологічні характеристики макроміцетів у глибинній культурі

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

3. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЄКТУ

3.1. Резюме стартап проекту

Загальна характеристика розробки

Тема: розробка мультиферментного препарату, що містить ряд ферментів (лактазу, тирозиназу, манган- і лігнінпероксидазу) для знебарвлення синтетичних барвників на основі культуральної рідини *Trametes versicolor* 353

Мета проекту: створити ферментний препарат для знебарвлення синтетичних барвників

Суб'єкт замовлення: завод ферментних препаратів ТОВ «ЕНЗИМ»

Об'єкт дослідження: комплекс ферментних препаратів, що володіють знебарвлюючим ефектом

Місце розробки а інноваційному ланцюжку цінності: ідея знаходиться на етапі розробки, проводяться додаткові дослідження щодо підвищення активності комплексу ферментів та підбору більш оптимального поживного середовища

Місце товару у міжнародній класифікації товарів: клас 1, біологічні препарати для використання в промисловості та науці

Цінність: новий ефективний мультиферментний препарат для знебарвлення синтетичних барвників

Гранична корисність товару: ефективне знебарвлення і очистка синтетичних барвників

Таблиця 3.1. Резюме стартап проекту

Показник	Характеристика
1	2
1. Сутність ідеї	Розробка мультиферментного препарату на основі культуральної рідини макроміцету <i>T. versicolor</i> , який буде використовуватись для екологічно безпечного видалення забруднень та синтетичних барвників

Продовження таблиці 3.1

1	2
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	В Україні відсутні аналоги та препарати на основі культуральної рідини макроміцетів, окрім цього відсутні аналоги мультиферментних препаратів вказаного у стартапі складу. Наявні у світі за функціональним призначенням аналоги: чистий препарат лаккази від Bioven Ingredients (Індія) та лаккази Sunson (Китай)
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Стартап передбачає підбір оптимального поживного середовища для синтезу більшої кількості ферментів, подальша розробка технології виробництва мультиферментного препарату
4. Сутність розробленості технології реалізації	Технологія на стадії розробки
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 5 Базовий номер 010291
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	24.66 – Виробництво іншої хімічної продукції для промислових цілей
7. Очікувана потужність стартапу	Мале підприємство
8. За масштабом виробництва	Серійне
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
10. За ресурсами, що споживатимуться	Капіталомістке, матеріаломістке
11. За чисельністю персоналу	Мале
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
13. Бажане географічне розташування - потужностей стартапу; - офісу стартапу;	Потужності стартапу проекту та офіс знаходяться на підприємстві заводу ферментних препаратів «Ензим».

Продовження таблиці 3.1

1	2
<p>- збутової мережі; - постачальників комплектуючих</p>	<p>Мережа збуту буде налагоджена всіма областями України. Постачальник обладнання та комплектуючих національні та міжнародні.</p>
<p>14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу</p>	<p>У розробці</p>
<p>15. Гранична корисність ідеї стартапу</p>	<p>При очищенні стічних вод часто застосовуються хімічні препарати, що потребує їх додаткового видалення із середовища, ферментний препарат буде спрямований на знебарвлення часто використовуваних синтетичних барвників і є екологічно безпечним</p>
<p>16. Бізнес-модель стартапу</p>	<p>B2B</p>
<p>17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)</p>	<p>Вітчизняних конкурентів наразі немає</p>
<p>18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)</p>	<p>Відомі іноземні аналоги що містять або один фермент, лакказу від Bioven Ingredients (Індія) та Sunson (Китай). Ціна складає близько 24-109 \$, що еквівалентно за кг для обох виробників.</p>
<p>19. Ключові фактори успіху стартапу</p>	<p>Екологічна безпечність та висока ефективність видалення барвників</p>
<p>20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)</p>	<p>Основними споживачами є підприємства легкої промисловості, а саме текстильної галузі. Крім того, споживачами можуть бути представники інших сфер промисловості, де у стічних водах містяться синтетичні барвники.</p>
<p>21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації</p>	<p>Одна серія продукту – 125 кг</p>

Продовження таблиці 3.1

1	2
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	51 356 упаковок
23. Споживачі на етапі розвитку	На етапі розвитку основними споживачами є невеликі підприємства текстильної галузі
24. Споживачі на етапі зрілості	На етапі зрілості споживачами будуть всі підприємства, на яких застосовуються синтетичні барвники
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	1050 грн/кг (~30 \$)
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	25%
27. Капіталовкладення в проект	1 705 000 грн
28. Період повернення капіталовкладень у проект	4 роки
29. Джерела фінансування	Внутрішні, зовнішні
30. Основні компоненти продукції стартапу (їх частка у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Основним компонентом є культуральна рідина штаму <i>T. versicolor</i> 353, що містить чотири ферменти: лакказу, тирозиназу, манган- та лігнінпероксидазу
31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки	Українські та іноземні підприємства
32. Планове місце реалізації результату розробки	Реалізація передбачається на сайті компанії Enzym

Кінець таблиці 3.1

1	2
33. Наявність посередників при реалізації	Відсутні
34. Методи просування результатів розробки на ринок	Надсилання зацікавленим сторонам пробників із продуктом і проведення рекламної кампанії

3.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Таблиця 3.2. Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища

Критерії	Загрози	Можливості
1	2	3
<i>Економіка</i>		
1. Інфляція	Зниження споживчої спроможності населення; вплив на закупівельні ціни та прибуток	Переорієнтація на інші ринки збуту; застосування сировини вітчизняного виробництва
2. Зростання податків	Збільшення витрат; зменшення прибутку	Пошук платоспроможних покупців
<i>Політика</i>		
1. Екологічна політика	Байдужість політичних діячів до екологічних способів очистки стічних вод	Запровадження та дотримання законів щодо чистоти стічних вод після хімічної очистки
2. Фінансова політика	Невигідні умови кредитування	Залучення іноземних інвестицій
3. Соціальна політика	Формування соціальної нерівності на підприємстві	Створення нових робочих місць
<i>Географія</i>		
1. Розташування виробничих потужностей	Ускладнення дистриб'юції до промислових регіонів України	Можливість дистриб'юції на іноземні ринки
<i>Демографія</i>		
1. Урбанізація	Зосередження кадрів у промислових центрах країни	Формування нових кадрів

Продовження таблиці 3.2

1	2	3
2. Наявність висококваліфікованих фахівців	Необхідність забезпечення високою заробітною платнею	Ефективне виконання доручень
3. Міграція кадрів за кордон	Створення конкурентоздатних умов праці	Формування нових кадрів
<i>Науково-технічний прогрес</i>		
1. Впровадження нових технологій	Тривалість розробок та необхідність залучення додаткових коштів	Створення більш мультифункціонального продукту
2. Співпраця з іноземними спеціалістами	Поширення наукових доробок до конкурентів	Залучення додаткових знань для створення продукту
<i>Культура</i>		
1. Зацікавленість у впровадженні екотехнологій	Небажання споживачів використовувати продукт	Проведення просвітницької діяльності у сфері екологічних методів очистки води

Факторами зовнішнього середовища є постачальники, конкуренти, посередники, споживачі, тощо.

Таблиця 3.3. Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти	Розробка більш якісного продукту	Зниження ціни чи монополізація ринку
Постачальники	Використання якісної продукції	Підвищення цін або зниження якості товару
Споживачі	Використання ефективного препарату для очищення від синтетичних барвників	Необізнаність у користуванні ферментними препаратами

За результатом аналізу факторів впливу формуємо перелік зацікавлених сторін для визначення потенційних загроз, які можуть виникнути у процесі провадження стартап проєкту (таблиця 3.4)

Таблиця 3.4. Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проєкту	Цікавість її до проєкту	Загальний коефіцієнт впливу на проєкт
<i>Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища</i>			
Виробники (конкуренти):	5	3	4
Постачальники:	5	2	3,5
Споживачі:	4	4	4
<i>Зовнішнє середовище</i>			
Політичні структури	4	3	3,5
Суб'єкти економічного середовища	4	3	3,5
Власники географічних об'єктів	5	5	5
Суб'єкти демографії	4	4	4
Суб'єкти культурного середовища	3	4	3,5
Суб'єкти НТП	4	3	3,5

Таблиця 3.5. Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Критерії	Переваги	Недоліки
1	2	3
Організаційна структура та управління	Невеликий штат працівників	Відсутність спеціалістів з належним рівнем знань
Географічне розташування	Швидше розповсюдження на європейський ринок Менші зарплати для працівників на виробництві	Віддаленість від потенційних споживачів серед українських підприємств Менша мотивація працівників для роботи

Продовження таблиці 3.5

1	2	3
Виробничий процес	Доступність сировини Можливість адаптувати технологічний процес під культивування макроміцетів	Великі капіталовкладення Необхідність додаткового навчання працівників
Маркетинг	Поширення екологічних методів очистки стічних вод на підприємствах	Великі витрати на періодичну рекламну кампанію
Конкуренція	Більша ефективність препарату	Наявність готового виробництва
Фінанси	Перспектива залучення іноземних інвестицій	Складний період світової економіки та замороження інвестування в проєкти на території України

Проаналізувавши усі середовища проєкту можна стверджувати, що даний стартап проєкт є перспективним. Для інвесторів буде запропоновано штамп-продуцент ферментного препарату та його основні складові.

3.3. Визначення ключових факторів успіху проєкту

В якості потенційних конкурентів обрано наступні ферментні препарати, які мають аналогічне функціональне призначення. Оцінка характеристики оцінювалась за п'ятибальною шкалою, коефіцієнт значущості показника лежить в межах від 0 до 1.

Таблиця 3.6. Оцінка характеристики за методом Шонфільда

№	Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристики		
			Новий продукт	Лакказа Bioven Ingredients	Лакказа Sunson
1	2	3	4	5	6
1	Ефективність ферментного препарату	0,4	5	2	4
2	Функціональність ферментного препарату	0,3	4	2	3

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5	6
3	Ціна	0,1	3	1	2
4	Зручність пакування	0,1	4	4	2

З урахуванням коефіцієнта вагомості характеристики визначаємо оцінку кожної характеристики для даної продукції і для конкурентів.

Таблиця 3.7. Розрахунок характеристик

№	Характеристика	Бальна оцінка характеристик		
		Новий продукт	Лакказа Bioven Ingredients	Лакказа Sunson
1	Ефективність ферментного препарату	$5 \cdot 0,4 = 2,0$	$2 \cdot 0,4 = 0,8$	$4 \cdot 0,4 = 1,6$
2	Функціональність ферментного препарату	$4 \cdot 0,3 = 1,1$	$2 \cdot 0,3 = 0,6$	$3 \cdot 0,3 = 0,9$
3	Ціна	$3 \cdot 0,1 = 0,3$	$1 \cdot 0,1 = 0,1$	$4 \cdot 0,1 = 0,4$
4	Зручність пакування	$4 \cdot 0,1 = 0,4$	$4 \cdot 0,1 = 0,4$	$2 \cdot 0,1 = 0,2$

На підставі розрахованих балів побудовано графік (рис. 3.1) порівняння конкурентних переваг виробництва ферментного препарату з аналогами.

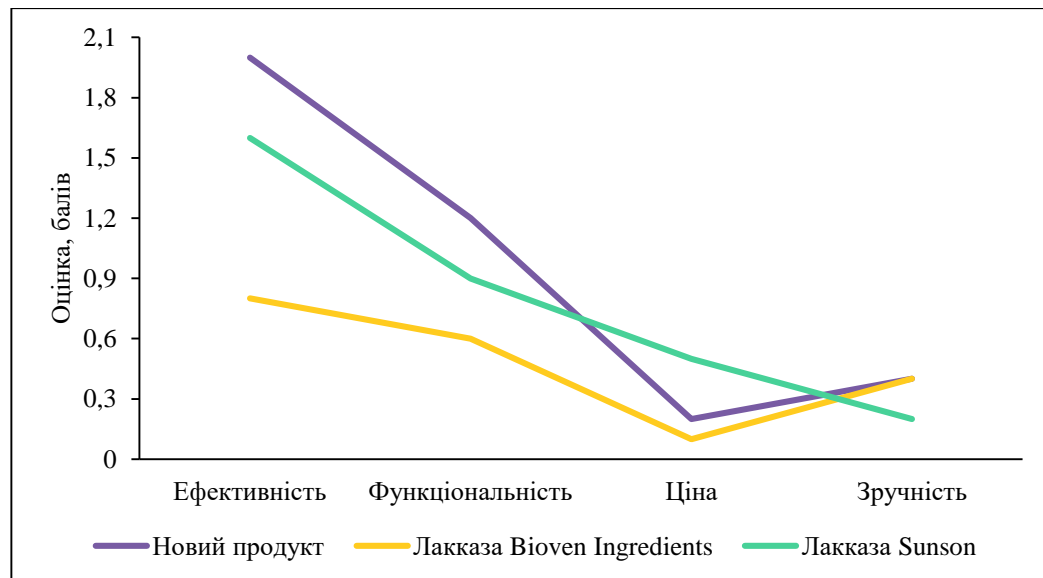


Рис. 3.1. Графік порівняння конкурентних переваг

Отже, запропонований нами ферментний препарат є більш функціональним та ефективним для видалення синтетичних барвників. Однак

він поступається за готовністю до реалізації обом аналогам, а також ціною відносно продукту Лакказа Sunson.

3.4. Визначення потенційних споживачів

Таблиця 3.8. Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
<i>Юридична особа</i>	
1. Форма власності	Приватне
2. КВЕД	13.10 Підготування та прядіння текстильних волокон 13.30 Оздоблення текстильних виробів 13.92 Виробництво готових текстильних виробів, крім одягу
3. За потужністю	Малі, середні
4. За масштабом виробництва	Серійне і масове
5. за рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні
6. За ресурсами, що споживаються	Матеріаломістке
7. За чисельністю персоналу	Малі, середні
8. За сферою діяльності	Комерційні, посередницькі, виробничі
9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні, змішані
10. За географічним розташуванням	Україна
11. За віддаленістю органів управління	Національні
12. За характером господарської діяльності	Текстильна промисловість
13. За рівнем технологічної цілісності	Головні, філії
14. За долею іноземного капіталу	Відсутні, з іноземними інвестиціями
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні і корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	Періодичні
17. За роботою протягом року	Позасезонні
18. За географічним розташуванням на території України	Вся територія України

Таблиця 3.9. Основні групи потенційних споживачів та їх потреби

Категорія клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою нового продукту
Ті, що застосовують «зелені» технології	Продукт використовує ферментні комплекси макроміцету, що є екологічно безпечним
Ті, що шукають ефективні методи деколоризації	Ферментний препарат є високоефективним до знебарвлення синтетичних барвників
Ті, що шукають національного виробника	Ферментний препарат буде українського виробництва

Таблиця 3.10. Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	Значення
Організаційно-правова форма	Приватне підприємство
Класифікація - за потужністю - за чисельністю персоналу - за сезонністю виробництва	Середнє Середнє Позасезонне
Розташування	Вся територія України
Вид продукту, який потрібен споживачеві	Засоби очищення стічних вод
Призначення розробки	Препарат для деколоризації синтетичних барвників
Потенційний обсяг споживання розробки	1 пачка / 1 м ³ стічних вод

Таблиця 3.11. Запланований обсяг реалізації стартап проєкту

Місяць	Червень 2023	Липень 2023	Серпень 2023	Вересень 2023	Жовтень 2023	Листопад 2023	Грудень 2023	Січень 2024	Лютий 2024	Березень 2024	Квітень 2024	Травень 2024
Запланований обсяг	5 000 упаковок	5 000 упаковок	7 500 упаковок	10 000 упаковок	12 500 упаковок	12 500 упаковок	15 000 упаковок	15 000 упаковок	17 500 упаковок	20 000 упаковок	25 000 упаковок	25 000 упаковок

3.5. Ціна пропозиції на ринку

Формуванням собівартості стартап проєкту не починають, як у звичайній підприємницькій діяльності, а закінчують роботу над фінансовими

показниками. Верхня межа собівартості продукту формується після оцінки ринкової ціни товару і визначення рівня його прибутковості.

Визначення потенційного споживача і його особливостей при прийнятті рішення про придбання стартап-продукту дозволяє визначити ціну пропозиції для ідеї, технології, методики, програми на ринку.

Таблиця 3.12. Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги			
			Лакказа Bioven Ingredients		Лакказа Sunson	
	Кількість, уп./рік	Ціна, грн/од	Кількість, уп./рік	Ціна, грн/од	Кількість, уп./рік	Ціна, грн./од
Ферментний препарат	65 000	105	720 000	400	1 200 000	90

Собівартість продукції (річний випуск) складається з:

- приміщення – 0 грн/рік;
- обладнання (яке слід додатково закупити) – 150 000 грн;
- амортизація – 99 450 грн/рік;
- інструменти – 80 000 грн/рік;
- сировина і матеріали – 2 402 300 грн/рік;
- витрати на енергію та паливо – 815 216 грн/рік;
- заробітна плата робітникам – 1 272 000 грн/рік;
- ремонт і утримання основних засобів – 100 000 грн/рік;

$C = 99\,450 + 80\,000 + 2\,402\,300 + 815\,216 + 1\,272\,000 + 100\,000 = 3\,918\,966$ грн/рік.

1. Витратний метод:

Приймаємо мінімальний рівень рентабельності 5%.

Очікувана собівартість стартап-продукту встановлена на рівні 71,8 грн за одиницю.

$C = C + \text{фіксований \% прибутку (від собівартості), (грн/од):}$

$$C = 71,8 + 3,6 = 75,4 \text{ (грн/од)}$$

2. Параметричний метод – враховує вагомість якісних параметрів товару і оцінку цих параметрів споживачем (табл. 3.13):

$$C_{\text{нovoї моделі}} = C_{\text{базової моделі}} \cdot \frac{\text{Балова оцінка нової моделі}}{\text{Балова оцінка базової моделі}}, \text{ (грн/од)}$$

Таблиця 3.13. Розрахунок ціни параметричним методом

Продукт	Параметри										Ціна
	1. Ефективність		2. Функціональність		3. Екологічність		4. Ціна		5. Зручність		
	Бали	КВ	Бали	КВ	Бали	КВ	Бали	КВ	Бали	КВ	
											Одного балу = $\frac{90}{4 \cdot 0,4 + 3 \cdot 0,3 + 4 \cdot 0,1 + 2 \cdot 0,1 + 2 \cdot 0,1} =$ $= 25$
Лакказ а Sunson	4	0,4	3	0,3	4	0,1	2	0,1	2	0,1	90 грн/од
Новий продук т	5		4		4		3		4		$90 \cdot (5 \cdot 0,4 + 4 \cdot 0,3 + 4 \cdot 0,1 + 3 \cdot 0,1 + 4 \cdot 0,1) =$ $= 105 \text{ грн/од}$

Примітки: КВ – коефіцієнт вагомості

3. Метод ціноутворення на основі поточних цін або конкурентний метод.

Конкурент 1 (Лакказа Sunson) – ціна 90 грн, конкурент 2 (Лакказа Bioven Ingredients) – ціна 400 грн. Тоді:

$$C = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{n} = \frac{90 + 400}{2} = 245 \text{ грн/од}$$

4. Метод на основі аналізу точки беззбитковості:

Таблиця 3.14. Калькуляція собівартості стартап-проекту

№ п/п	Етап розробки/елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1	Розробка ідеї стартапу: - сировина, матеріали - заробітна плата - електроенергія	- 1 маркетолог 150 кВт	5 000 грн 19 000 грн 960 грн
2	Додаткові дослідження - сировина, матеріали - електроенергія	- 400 кВт	7 500 грн 2 560 грн
3	Закупівля обладнання та матеріалів - сировина та матеріали - обладнання - електроенергія	- 5 шт 500 кВт	249 000 грн 335 000 грн 3 00 грн
4	Впровадження у виробництво - сировина, матеріали - обладнання - заробітна плата - ресурси - інше		1 402 300 грн/рік 540 000 грн 1 272 000 грн/рік 751 022 грн/рік 180 000 грн

Таблиця 3.15. Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Початкова вартість ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
1	2	3	4	5
Допоміжні роботи	Обладнання для приготування реактивів та робочих розчинів	260 000	«Лабтайм», Україна «ХІММАШ-НАФТОГАЗ», Україна	Кошти підприємства, яке підлягає реконструкції, інвестиції
	Лабораторне обладнання	250 000	«Лабтайм», Україна	

Продовження таблиці 3.15

1	2	3	4	5
Виробництво	Апарат для посівного матеріалу	265 000	«ХІММАШ-НАФТОГАЗ», Україна	Кошти підприємства, яке підлягає реконструкції, інвестиції
	Ферментер	780 000	«ХІММАШ-НАФТОГАЗ», Україна	
	Додаткове обладнання для виробництва	150 000	Україна, Європа	

Таблиця 3.16. Забезпеченість проекту оборотними засобами

Група ОБФ	Назва	Норма витрат на рік	Ціна грн./од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина та матеріали	Матеріал и для лабораторії	1 402 300 грн	-	«Лабтайм», Україна Місцеві виробники деревообробної продукції	Кошти підприємства, яке підлягає реконструкції, інвестиції
	Запасні матеріали	180 000	-	Виробники основної продукції	
Ресурси	Електроенергія	150,2 МВт	430,25	Комунальний постачальник	
	Водопостачання та водовідведення	12 800 м ³	58,64	Комунальний постачальник	

Таблиця 3.17. Забезпеченість проєкту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень заробітної плати, грн	Джерело фінансування ФОП
Професіонали	Міколог	4	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за професією інженера-технолога — не менше 1 року	15 000	Кошти підприємства, яке підлягає реконструкції
Робітник	Лаборант	2	Повна або базова загальна середня освіта. Професійно-технічна освіта або підготовка безпосередньо на виробництві	13 000	
Керівники	Біотехнолог	1	Повна або базова вища освіта відповідного напрямку підготовки (спеціаліст або бакалавр). Стаж роботи з оперативного управління виробництвом — не менше 2 років	20 000	
Сума з неї нарахування:				103 000 22 660	

Враховуючи дані з таблиць 3.14-3.17, встановлюємо ціну 105 грн/од продукту та розраховуємо точку беззбитковості (рис. 3.2).

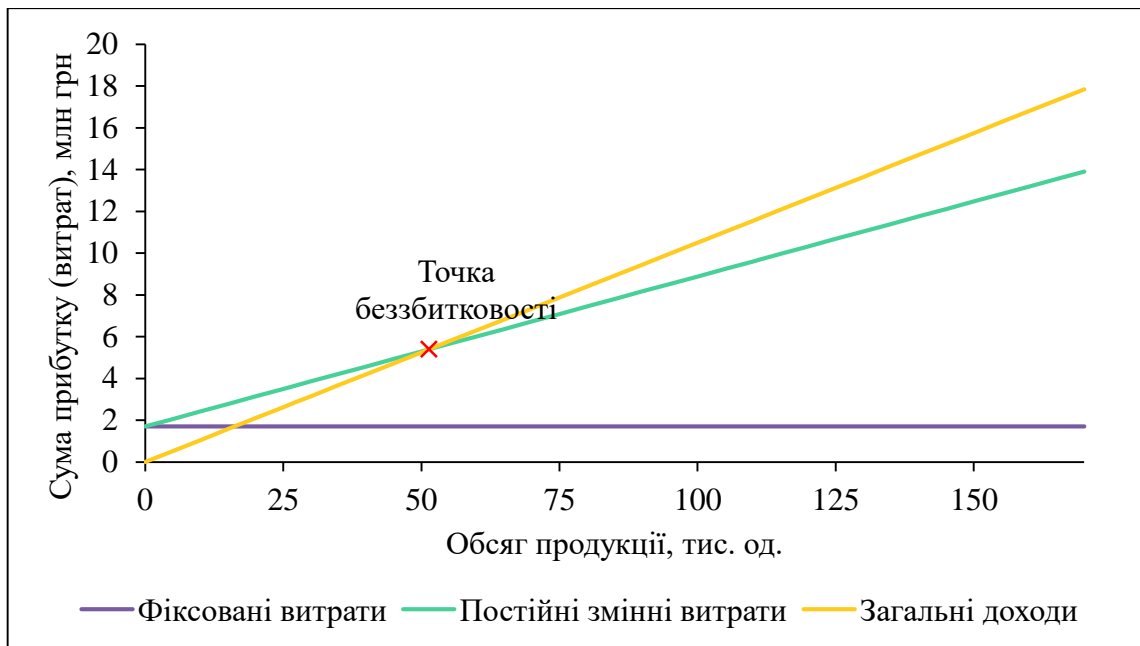


Рисунок 3.2. Графік знаходження точки беззбитковості

Таким чином, точкою беззбитковості є досягнення однакової суми доходів та витрат, що в нашому випадку становить 5 392 380 грн. В товарному еквіваленті 51 356 од продукту.

Таблиця 3.18. Джерела фінансування для підприємства, яке працює за місцем їх виникнення

Запозичені	Власні
1) бюджетні інвестиції, у т. ч.: - державний бюджет; - місцеві бюджети; - комерційні гранти; - спеціальні фонди і програми. 2) кредитні кошти. 3) інші кошти, у т.ч.: - розміщення цінних паперів; - іноземні інвестиції; - лізинг; - благодійні фонди.	- амортизація; - нерозподілений прибуток; - статутний капітал; - продаж активів; - доходи від акцій.

Таблиця 3.19. Види інвестицій

Фінансові	Матеріальні
Іноземні; Депозитні операції підприємств; Пайова участь у спільних підприємствах; Цінні папери; Інвестиційний лізинг; Довгострокові кредити банків.	Права на земельні ділянки; Права на товарний знак; Авторське право.
З власних джерел	
Амортизаційні відрахування; Торгова націнка;	Транспортні засоби.
Для зацікавлених промислових інвесторів	
Інвестиції у дочірні підприємства; Акціонування	Лізинг; Селенг

Таблиця 3.20. Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення формула розрахунку
1	2	3
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Од.	$B = 65\ 000$
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	Осіб	$Q_{\text{сп}} = Q_{\text{яв}} \cdot K_{\text{пер}}$ $Q_{\text{сп}} = 7$
3. у тому числі - основних - допоміжних - інженерно-технічного персоналу	Осіб	5 - 2
4. Середньорічний виробіток робітника	Од/особу	$ПП_{\text{с.р.}} = \frac{B}{Q_{\text{сп}}}$ $ПП_{\text{с.р.}} = 9286$
5. Капіталовкладення у проект: - всього - на одиницю продукції	Грн Грн/од	$K = OF + OBK = 6374516$ $K = 49,04$
6. Повна собівартість - всього - на одиницю продукції	Грн Грн/од	$C = A + OBK = 4\ 768\ 966$ $C = 36,68$
7. Відносний прибуток	Грн/од	$\Pi = Ц - C$ $\Pi = 12,36$

Продовження таблиці 3.20

1	2	3
8. Рентабельність	%	$P = \frac{\Pi}{C} \cdot 100$ $P = 25,2$
9. Період повернення капіталовкладень	Років	$T_{\text{пов}} = \frac{K}{\Pi}$ $T_{\text{пов}} = 3,97$
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн/грн	$\Phi B = \frac{Ц \cdot B}{O\Phi}$ $\Phi B = 4$
11. Фондоємність	Грн/грн	$\Phi C = \frac{1}{\Phi B}$ $\Phi C = 0,25$
12. Продуктивність праці	Грн/особу	$ПП = \frac{B}{\chi_{\text{сп}} \cdot T_{\text{пов}}}$ $ПП = 2\,338,97$
13. Коефіцієнт економічної ефективності		$E = \frac{\Pi}{K}$ $E = 0,25$

3.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Таблиця 3.21. Карта бізнес-процесів виконання стартап проекту

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу, днів	Верхня межа фінансових витрат, грн
1	2	3	4	5
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	Інтелектуальні Інформаційні Часові Матеріальні Трудові	2	0
	Аналіз можливостей		1	
	Аналіз ринку		1	
	Виявлення споживачів та опитування		3	

Продовження таблиці 3.21

1	2	3	4	5
Розробка ідеї стартапу	Дослідження джерел фінансування	Аналогічно	1	0
Реалізація ідеї	Пошук інвесторів	Інтелектуальні Інформаційні Часові Матеріальні Трудові Нематеріальні	15-20	
	Пошук робітників		5-10	
	Заклучення договорів		4-7	
	Підписання договорів	Інтелектуальні Часові Матеріальні Трудові Нематеріальні Фінансові	1-2	1 500
	Закупівля обладнання	Інформаційні Часові Трудові Фінансові	4-7	250 000
	Закупівля матеріалів і сировини	Інтелектуальні Часові Матеріальні Трудові Фінансові Нематеріальні	5-10	650 000
Впровадження у виробництво	Створення прототипу	Інтелектуальні Часові Матеріальні Трудові Фінансові Нематеріальні	10-14	125 000
	Дослідження прототипу		20	115 000
	Закупівля обладнання		10	950 000
	Інші витрати		10-20	180 000
Масова реалізація	Закупівля сировини і матеріалів	Інтелектуальні Матеріальні Трудові Фінансові Нематеріальні	14	700 000
	Налагодження ланцюгів поставок		14-21	35 000
Сума			120-163	3 006 500

Таблиця 3.22. Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи				
	Автор	Розробники	Маркетолог	Робітники	Відділ матеріально-технічного постачання
Генерація ідеї	+				
Аналіз можливостей	+				
Аналіз ринку	+	+			
Виявлення споживачів та опитування	+	+			
Дослідження джерел фінансування	+	+			
Пошук інвесторів	+	+			
Пошук робітників		+			
Заклучення договорів	+				
Закупівля обладнання	+	+			+
Просування товару	+	+	+		
Створення прототипу	+	+	+	+	+
Дослідження прототипу	+	+	+		
Маркетингові дослідження	+	+	+		
Пробний запуск	+	+		+	+
Виробництво	+	+		+	+
Контроль постачання сировини	+	+		+	+
Налагодження ланцюгів поставок готового продукту	+	+			+

3.7. Ризики стартап проекту та методи управління ними

Таблиця 3.23. Ризики інноваційної розробки

Назва процесу/стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
1	2	3	4
Розробка ідеї стартапу	Розробка ідеї	Підвищення витрат на розробку внаслідок коливань курсу валют	Відсутність необхідного рівня фінансування

Продовження таблиці 3.23

1	2	3	4
Розробка ідеї стартапу	Розробка бізнес-плану	-	Неправильне планування
	Аналіз ринку збуту	Відсутність великої кількості споживачів	Неправильний аналіз ринку збуту
	Формування команди	Брак спеціалістів	Найм некваліфікованих працівників
	Аналіз джерел сировини та матеріалів	Відсутність дешевої сировини	Відсутність необхідного рівня фінансування
	Визначення ціни продукту	Відсутність необхідного рівня фінансування	Неправильні методики аналізу
Реалізація ідеї	Пошук інвесторів	Відсутність зацікавленості інвесторів	Мала обізнаність про інвестиційні фонди
	Оформлення патенту	Несвоєчасність виконання послуг	Неправильне формування заявки, патенту тощо
	Заключення договору з банком	Збанкрутування банку або інфляція	Неспроможність виплати кредиту
	Заключення договору з постачальниками	Банкрутство фірми-постачальника	Неспроможність виплати
	Заключення договору з орендодавцями	Відмова надання послуг	Неспроможність виплати
	Заключення договору з реалізаторами	Відмова реалізації, банкрутство	Неякісне комплектування
	Розробка маркетингової політики	Брак кваліфікованих спеціалістів	Відсутність необхідного рівня фінансування
Впровадження у виробництво	Початок дії договорів	Підробка документів	Найм некваліфікованих працівників

Кінець таблиці 3.23

1	2	3	4
	Впровадження маркетингу	Брак кваліфікованих спеціалістів	Відсутність необхідного рівня фінансування
	Запуск пробної партії	Відсутність споживчого попиту на продукт	Необхідність доопрацювання
Масова реалізація	Доставка товару	Поломка транспорту	Неможливість доставки у всі точки збуту
Закриття або продаж проекту (якщо передбачено)	-	-	-

Таблиця 3.24. Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
1	2	3	4
<i>Зовнішні ризики</i>			
Ринковий	Відсутність дешевої сировини	0,4	0,5
	Відсутність великої кількості споживачів	0,2	0,9
	Відмова надання послуг	0,1	0,99
	Відмова реалізації	0,1	0,99
	Відсутність споживчого попиту на продукт	0,1	0,9
Демографічний	Брак кваліфікованих спеціалістів	0,1	0,95
Інвестиційний	Відсутність зацікавленості інвесторів	0,05	0,8
	Відсутність необхідного рівня фінансування	0,15	0,8
Економічний	Інфляція	0,2	0,7
	Збанкрутування банку	0,1	0,9

Продовження таблиці 3.24

1	2	3	4
Економічний	Банкрутство фірми-постачальника	0,3	0,85
	Банкрутство фірми-реалізатора	0,3	0,85
Науково-технічний	Несвоєчасність виконання послуг (патентне бюро)	0,05	0,9
Технічний	Неякісні товари	0,3	0,9
	Поломка транспорту	0,1	0,7
<i>Внутрішні ризики</i>			
Фінансовий	Неспроможність виплати кредиту/інших зобов'язань	0,025	0,99
Аналітичний	Неправильне планування	0,1	0,85
	Неправильний аналіз ринку збуту	0,05	0,9
	Неправильні методики аналізу	0,025	0,9
Інформаційний	Мала обізнаність про інвестиційні фонди	0,01	0,95
	Затримка розробки кінцевого продукту	0,3	0,99
Кадровий	Найм некваліфікованих працівників	0,02	0,9
Технічний	Неякісне комплектування	0,1	0,85
	Необхідність корегування технології	0,1	0,9
Транспортний	Неможливість доставки у всі точки збуту	0,05	0,85

Таблиця 3.25. Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику	Числове значення	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
		1	2	3
Високий рівень впливу	3	3* Неспроможність виплати кредиту/інших зобов'язань	6* Інфляція	9* Відсутність великої кількості споживачів
Середній рівень впливу	2	2* Відсутність споживчого попиту	4* Найм некваліфікованих працівників	6* Затримка розробки кінцевого продукту
Низький рівень впливу	1	1* Неправильне планування	2* Мала кількість кваліфікованих кадрів	3* Необхідність корегування технології

Таблиця 3.26. План заходів з управління ризиками

Назва ризику		Назва методу управління ризиком	Відповідальні і виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
1		2	3	4	5
Зовнішні	Ринковий	Попередження ризику (стратегічне планування діяльності; прогнозування зовнішньої економічної ситуації; моніторинг соціально-економічного та правового середовища; активний цілеспрямований маркетинг)	Автор проекту та маркетолог	Перед впровадженням у виробництво	Високий попит на продукцію, знаходження нових ринків збуту, знаходження інших постачальників послуг, які будуть готові до співпраці, надходження продукції від альтернативного постачальника
	Демографічний	Уникнення ризику (власна система підготовки та перепідготовки кадрів)	Розробники	На етапі набору працівників	Буде працювати лише кваліфікований персонал, який не буде допускати критичних помилок

Продовження таблиці 3.26

	1	2	3	4	5
Зовнішні	Інвестиційний	Попередження (стратегічне планування діяльності), уникнення (знайти інші джерела інвестицій)	Розробники	Перед впровадженням у виробництво / у разі виникнення проблем з фінансуванням	Інвестори зацікавлені у фінансуванні або заміна інвесторів
	Економічний	Страховання (укладання договору зі страховою компанією)	Автор	На етапі впровадження у виробництво	Підприємство застраховане, у випадку банкрутства партнерів виплата відшкодування
	Науково-технічний	Попередження (укладання договору із зазначенням штрафів за несвоєчасність виконання послуг)	Автор	На етапі впровадження у виробництво	Послуги надані вчасно або виплачено штраф
	Правовий	Ухилення (відмова від ненадійних партнерів)	Розробники	На етапі оформлення документів	Співпраця з перевіреними партнерами

Продовження таблиці 3.26

	1	2	3	4	5
Зовнішні	Технічний	Ухилення (відмова від ненадійних партнерів), прийняття (самострахування, кредитування)	Розробники	У разі виникнення проблем з товарами або транспортом	Співпраця з перевіреними постачальниками, відновлення роботи транспорту
Внутрішні	Фінансовий	Ухилення (відмова від прийняття ризикованих проєктів, рішень), попередження (стратегічне планування діяльності; прогнозування зовнішньої економічної ситуації)	Розробники	Після реалізації проєкту	Відсутній ризик у зв'язку з відмовою від прийняття ризикованих проєктів або рішень
	Аналітичний	Попередження (здобуття додаткової інформації; стратегічне планування діяльності;	Розробники	На етапі планування та аналізу ринку	Поглиблений аналіз ринку та вибудовування стратегій розвитку

Продовження таблиці 3.26

	1	2	3	4	5
Внутрішні		моніторинг соціально-економічного та правового середовища; активний цілеспрямований маркетинг)			
	Інформаційний	Попередження (здобуття додаткової інформації)	Розробники	На етапі розробки	Достатня інформованість
	Кадровий	Уникнення ризику (власна система підготовки та перепідготовки кадрів)	Розробники	На етапі набору працівників	Буде працювати лише кваліфікований персонал, який не буде допускати критичних помилок
	Організаційний	Попередження (здобуття додаткової інформації, перевірка коректності документів)	Розробники	На етапі оформлення документів	Уважна перевірка документів, відсутність помилок

Кінець таблиці 3.26

	1	2	3	4	5
Внутрішні	Технічний	Ухилення (відмова від ненадійних постачальників), прийняття (самострахування)	Розробники	На етапі виробництва	Співпраця з перевіреними постачальниками, доопрацювання в разі необхідності
	Транспортний	Прийняття (покриття збитку з поточного доходу)	Розробники	На етапі масової реалізації	Покриття збитку та налагодження поставок

Враховуючи відсутність вітчизняних виробників ферментних препаратів для очищення стічних вод, наявність виробничих потужностей, на базі яких можна виробляти даний продукт, створення нового ферментного препарату є своєчасним. Розрахований період повернення капіталовкладень – менше 4 років, що може підвищити зацікавленість з боку інвесторів.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлено та проаналізовано нові дані по вивченню ростових, морфологічних та біосинтетичних особливостей базидієвих макроміцетів *Pleurotus ostreatus* (2 штамів) і *Trametes versicolor* (5 штамів) за культивування на агаризованих та рідких поживних середовищах на основі екстрактів тирси чотирьох деревних порід (берези, осики, бука, дуба), що дозволило отримати культуральну рідину як напівпродукт лігноцелюлолітичних ферментів, який може бути використаний у паперовій, деревообробній, текстильній та інших галузях промисловості.

1. В результаті дослідження ростових показників базидієвих грибів у поверхневій культурі встановлені максимальні швидкості росту та ростовий коефіцієнт при культивуванні на всіх досліджуваних середовищах. Виявлено, що екстракти тирси бука та дуба інтенсифікували синтез окисних ферментів, зокрема, лаккази.

2. Встановлено, що при культивуванні у стаціонарних умовах, екстракти тирси інтенсифікують ріст досліджуваних штамів на 35 – 105 %, найбільший приріст (в 1,7 – 2,5 разу) було зафіксовано для *P. ostreatus* на всіх досліджуваних середовищах. Виявлено вплив складу середовища на синтез лігноцелюлозних ферментів у стаціонарній культурі. Найбільший приріст ферментативної активності (карбоксиметилцелюлази та лігнінпероксидази) зафіксовано при культивуванні *T. versicolor* 5299 на середовищі з екстрактом тирсу бука – в 3,4 разу.

3. В результаті дослідження росту макроміцетів у глибинній культурі було встановлено, що концентрація біомаси *P. ostreatus* 8, *T. versicolor* 5299 збільшується у 2 рази. Культивування *T. versicolor* 353 на середовищі з додаванням екстракту тирси бука обумовлює значну інтенсифікацію ферментативної активності відносно контрольних значень: целюлазної – в 1,8

разу, карбоксиметилцелюлазної – в 3,1 разу, лакказної – 5,1 разу, тирозиназної – 2,7 разу, манганпероксидазної – 2,5 разу, лігнінпероксидазної – в 3 рази.

4. Виявлено інтенсифікацію знебарвлюючого ефекту культуральної рідини *T. versicolor* 353, отриманої після культивування на середовищі з екстрактом тирси бука, щодо всіх досліджуваних барвників. Спостерігалось зростання інтенсивності знебарвлення малахітового зеленого на 67,5 %, метиленового синього – 93,0 %, індигокарміну – 45,6 %, бромфенолового синього – 4,5 %, генціанвіолету – 83,2 %.

5. Встановлено наявність лінійної кореляції між концентрацією фенольних сполук у середовищі і накопиченням біомаси макроміцетів ($r > 89$ %). Визначено, що знебарвлення гетероциклічних та трифенілметанових барвників корелюється зі значеннями питомої ферментативної активності оксидаз і пероксидаз ($r^2 > 80$ %).

6. Розроблено стартап проєкт нового ферментного препарату, на основі культуральної рідини *T. versicolor* 353 після культивування на середовищі з екстрактом тирси бука.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Echezonachi S. O. Chapter 16 - The role of white rot fungi in bioremediation. *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation* / ред. J. A. Malik. 2022. С. 305–320.
2. Montoya S., Patiño A., Sánchez Ó. J. Production of lignocellulolytic enzymes and biomass of *trametes versicolor* from agro-industrial residues in a novel fixed-bed bioreactor with natural convection and forced aeration at pilot scale. *Processes*. 2021. Т. 9, № 2. С. 397.
3. Barshteyn V., Krupodorova T. Utilization of agro-industrial waste by higher mushrooms: modern view and trends. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2016. Т. 05, № 06. С. 563–577.
4. Enzymes from basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology / Т. М. Uber та ін. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 2023. С. 129–164.
5. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes / P. de Oliveira Rodrigues та ін. *Renewable Energy*. 2020. Т. 145. С. 2683–2693.
6. Manavalan T., Manavalan A., Heese K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*. 2014. Т. 70, № 4. С. 485–498.
7. Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste / М. Ти́ша та ін. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011. Т. 166, № 1. С. 36–46.
8. Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: a review / O. B. Chukwuma та ін. *Sustainability*. 2020. Т. 12, № 18. С. 7282.
9. Pollegioni L., Tonin F., Rosini E. Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal*. 2015. Т. 282, № 7. С. 1190–1213.

10. Valorisation of deinking sludge as a substrate for lignocellulolytic enzymes production by *Pleurotus ostreatus* / M. Vodovnik та ін. *Journal of Cleaner Production*. 2018. Т. 197. С. 253–263.
11. Lignocellulose degrading enzymes from fungi and their industrial applications / P. Kantharaj та ін. *International Journal of Current Research and Review*. 2017. Т. 9, № 21. С. 12.
12. Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications / A. D. Moreno та ін. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2019. Т. 95, № 3. С. 481–494.
13. Bioconversion in ryegrass-fescue hay by *Pleurotus ostreatus* to increase their nutritional value for ruminant / R. Astudillo-Neira та ін. *Agriculture*. 2022. Т. 12, № 4. С. 534.
14. Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste / J. Kumla та ін. *Molecules*. 2020. Т. 25, № 12. С. 2811.
15. Extracellular secretion of lignocellulolytic enzymes by diverse white rot asidiomycetes fungi / G. Thiribhuvanamala та ін. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*. 2017. Т. VI, № I. С. 20–29.
16. Emerging bioremediation technologies for the treatment of textile wastewater containing synthetic dyes: a comprehensive review / A. Srivastava та ін. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2021.
17. Enzymatic extract containing lignin peroxidase immobilized on carbon nanotubes: potential biocatalyst in dye decolorization / S. F. Oliveira та ін. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018. Т. 25, № 4. С. 651–659.
18. Hallmarks of basidiomycete soft- and white-rot in wood-decay -omics data of two armillaria species / N. Sahu та ін. *Microorganisms*. 2021. Т. 9, № 1. С. 149.
19. Martín J. A., López R. Biological deterioration and natural durability of wood in Europe. *Forests*. 2023. Т. 14, № 2. С. 283.

20. Fukasawa Y. Ecological impacts of fungal wood decay types: a review of current knowledge and future research directions. *Ecological Research*. 2021.
21. Gómez-Hernández M., Ramírez-Antonio K. G., Gándara E. Ectomycorrhizal and wood-decay macromycete communities along development stages of managed *Pinus patula* stands in Southwest Mexico. *Fungal Ecology*. 2019. T. 39. C. 109–116.
22. Characterizing the assemblage of wood-decay fungi in the forests of northwest Arkansas / N. Alshammari та ін. *Journal of Fungi*. 2021. T. 7, № 4. C. 309.
23. Wood decay fungi: an analysis of worldwide research / T. Li та ін. *Journal of Soils and Sediments*. 2022.
24. Anatomical, chemical and mechanical characteristics of beech wood degraded by two *Pleurotus species* / Y. Azimi та ін. *Drvna industrija*. 2020. T. 71, № 1. C. 47–53.
25. Wendi D., Wacoo A. P., Wise G. Identifying indigenous practices for cultivation of wild saprophytic mushrooms: responding to the need for sustainable utilization of natural resources. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2019. T. 15, № 1. C. 64.
26. Hiscox J., O'Leary J., Boddy L. Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in Mycology*. 2018. T. 89. C. 117–124.
27. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi / R. Riley та ін. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. T. 111, № 27. C. 9923–9928.
28. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monooxygenases / U. R. Ezeilo та ін. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017. C. 1–16.
29. Crystallization of polysaccharides / M. K. Yazdi та ін. *Polysaccharides*. 2021. C. 283–300.

30. Qiu W., Liu J. Fermenting and lignin degradability of a white-rot fungus *Coriolopsis trogii* using industrial lignin as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022.
31. Weng C., Peng X., Han Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnology for Biofuels*. 2021. T. 14, № 1.
32. M M., A A. Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2017. T. 08, № 02.
33. Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus* based on genomic and transcriptomic analyses / X. Qin та ін. *Biotechnology for Biofuels*. 2018. T. 11, № 1.
34. Pretreatment of radiata pine using two white rot fungal strains *Stereum hirsutum* and *Trametes versicolor* / E. Shirkavand та ін. *Energy Conversion and Management*. 2017. T. 142. C. 13–19.
35. Comparative analysis of enzyme production patterns of lignocellulose degradation of two white rot fungi: *Obba rivulosa* and *Gelatoporia subvermispora* / M. Marinović та ін. *Biomolecules*. 2022. T. 12, № 8. C. 1017.
36. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by *Inonotus obliquus* on straw biomass under submerged fermentation / X. Xu та ін. *Bioresource Technology*. 2017. T. 241. C. 415–423.
37. Haq I., Mazumder P., Kalamdhad A. S. Recent advances in removal of lignin from paper industry wastewater and its industrial applications – A review. *Bioresource Technology*. 2020. T. 312. C. 123636.
38. Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation / M. Andlar та ін. *Engineering in Life Sciences*. 2018. T. 18, № 11. C. 768–778.
39. Ward G., Hadar Y., Dosoretz C. The biodegradation of lignocellulose by white rot fungi. *Mycology*. 2003.

40. Tavares A. P. M., Pereira S. R., Xavier A. M. R. B. Biotechnological applications of *Trametes versicolor* and their enzymes. *Current Biotechnology*. 2017. T. 6, № 2. C. 78–88.
41. Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation / H. El-Ramady та ін. *Sustainability*. 2022. T. 14, № 6. C. 3667.
42. Goodell B., Winandy J. E., Morrell J. J. Fungal degradation of wood: emerging data, new insights and changing perceptions. *Coatings*. 2020. T. 10, № 12. C. 1210.
43. Soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi / A. Tunlid та ін. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Hoboken, NJ, USA, 2016. C. 257–275.
44. Nadir N., Liyana Ismail N., Shah Hussain A. Fungal pretreatment of lignocellulosic materials. *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*. 2019.
45. Tandon G. Bioproducts from residual lignocellulosic biomass. *Advances in Biotechnology*. 2015. C. 52–75.
46. Recent advancements in prebiotic oligomers synthesis via enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass / R. Saini та ін. *Bioengineered*. 2022. T. 13, № 2. C. 2139–2172.
47. Viña-Gonzalez J., Alcalde M. Directed evolution of the aryl-alcohol oxidase: beyond the lab bench. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020. T. 18. C. 1800–1810.
48. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes / S. Saldarriaga-Hernández та ін. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. T. 161. C. 1099–1116.
49. Textile dye biodecolorization by manganese peroxidase: a review / Y. Chang та ін. *Molecules*. 2021. T. 26, № 15. C. 4403.

50. Lignin peroxidase in focus for catalytic elimination of contaminants – A critical review on recent progress and perspectives / A. K. Singh та ін. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Т. 177. С. 58–82.

51. Abdel-Hamid A. M., Solbiati J. O., Cann I. K. O. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*. 2013. С. 1–28.

52. Lytic polysaccharide monooxygenases promote oxidative cleavage of lignin and lignin–carbohydrate complexes during fungal degradation of lignocellulose / F. Li та ін. *Environmental Microbiology*. 2021. Т. 23, № 8. С. 4547–4560.

53. Sista Kameshwar A. K., Qin W. Understanding the structural and functional properties of carbohydrate esterases with a special focus on hemicellulose deacetylating acetyl xylan esterases. *Mycology*. 2018. Т. 9, № 4. С. 273–295.

54. A novel thermostable and halotolerant xylanase from *u* / S. Carli та ін. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016. Т. 133. С. 508–517.

55. Shah F., Ranawat B., Mishra S. An approach toward cellulase production, bioconversion, and utilization. *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts*. 2019. С. 207–223.

56. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life / S. M. Cragg та ін. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015. Т. 29. С. 108–119.

57. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation / J. A. Bentil та ін. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Т. 102, № 14. С. 5827–5839.

58. Mini review: advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes / E. J. Okal та ін. *Microbial Pathogenesis*. 2020. Т. 147. С. 104410.

59. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels / M. Adsul та ін. *Enzyme and Microbial Technology*. 2020. Т. 133. С. 109442.

60. Effect of textile dyes on activity and differential regulation of laccase genes from *Pleurotus ostreatus* grown in submerged fermentation / V. Garrido-Bazán та ін. *AMB Express*. 2016. Т. 6, № 1.
61. Christopher L. P., Yao B., Ji Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Frontiers in Energy Research*. 2014. Т. 2.
62. Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation / P. Dwivedi та ін. *New Biotechnology*. 2011. Т. 28, № 6. С. 616–626.
63. Microbial lignocellulolytic enzymes for the effective valorization of lignocellulosic biomass: a review / P. Nargotra та ін. *Catalysts*. 2022. Т. 13, № 1. С. 83.
64. Chio C., Sain M., Qin W. Lignin utilization: a review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019. Т. 107. С. 232–249.
65. Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2010. Т. 01, № 03. С. 208–215.
66. Laccases–Versatile enzymes used to reduce environmental pollution / G. Paraschiv та ін. *Energies*. 2022. Т. 15, № 5. С. 1835.
67. Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bifunctional substrates / F. d’Acunzo та ін. *New Journal of Chemistry*. 2006. Т. 30, № 4. С. 583.
68. Singh Arora D., Kumar Sharma R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009. Т. 160, № 6. С. 1760–1788.
69. Kumar A., Chandra R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*. 2020. Т. 6, № 2. e03170.

70. Bokare A. D., Choi W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H_2O_2 in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*. 2014. T. 275. C. 121–135.
71. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases / M. Hofrichter та ін. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. T. 87, № 3. C. 871–897.
72. Zhuo R., Fan F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. *Science of The Total Environment*. 2021. T. 778. C. 146132.
73. Singh D., Zeng J., Chen S. Increasing manganese peroxidase productivity of *Phanerochaete chrysosporium* by optimizing carbon sources and supplementing small molecules. *Letters in Applied Microbiology*. 2011. T. 53, № 1. C. 120–123.
74. Kumar A., Arora P. K. Biotechnological applications of manganese peroxidases for sustainable management. *Frontiers in Environmental Science*. 2022. T. 10.
75. Wong D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008. T. 157, № 2. C. 174–209.
76. Kameshwar A. K. S., Qin W. Lignin degrading fungal enzymes. *Production of Biofuels and Chemicals from Lignin*. Singapore, 2016. C. 81–130.
77. Peculiarities of *Pycnoporus species* for applications in biotechnology / A. Lomascolo та ін. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011. T. 92, № 6. C. 1129–1149.
78. Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: laccase, peroxidase and tyrosinase / X. Li та ін. *Trends in Food Science & Technology*. 2020. T. 103. C. 78–93.
79. Jiang Z., Hu C. Selective extraction and conversion of lignin in actual biomass to monophenols: a review. *Journal of Energy Chemistry*. 2016. T. 25, № 6. C. 947–956.
80. Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis / S.-i. Shoda та ін. *Chemical Reviews*. 2016. T. 116, № 4. C. 2307–2413.

81. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review / F. Wang та ін. *Microorganisms*. 2019. Т. 7, № 12. С. 665.
82. Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts / B. Bertrand та ін. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013. Т. 30, № 1. С. 135–142.
83. The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions / D. Chmelová та ін. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. Т. 38, № 2.
84. A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation / G. Šelo та ін. *Foods*. 2021. Т. 10, № 5. С. 927.
85. Behera S. S., Ray R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. Т. 86. С. 656–669.
86. Sugarcane bagasse: an important lignocellulosic substrate for production of enzymes and biofuels / P. Yadav та ін. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022.
87. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes / P. Leite та ін. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2021. Т. 27. С. 100407.
88. Lignocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (jacq.:fr.) Kumm. (*Agaricomycetidae*) / V. Elisashvili та ін. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2003. Т. 5, № 2. С. 6.
89. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation / E. Kachlishvili та ін. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005. Т. 22, № 4. С. 391–397.
90. Multi-enzyme complex of white rot fungi in saccharification of lignocellulosic material / W. S. Cardoso та ін. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018. Т. 49, № 4. С. 879–884.

91. Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor* / A. Bucić-Kojić та ін. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016. T. 181, № 3. C. 948–960.

92. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace / D. Iandolo та ін. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010. T. 163, № 1. C. 40–51.

93. Ozcirak Ergun S., Ozturk Urek R. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*. 2017. T. 15, № 2. C. 273–277.

94. Robinson T., Nigam P. S. Remediation of textile dye wastewater using a white-rot fungus *Bjerkandera adusta* through solid-state fermentation (SSF). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008. T. 151, № 2-3. C. 618–628.

95. Levin L., Herrmann C., Papinutti V. L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 2008. T. 39, № 1. C. 207–214.

96. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: state of the art, challenges and opportunities / M. Tišma та ін. *Bioresource Technology*. 2021. T. 330. C. 124997.

97. Lizardi-Jiménez M. A., Hernández-Martínez R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*. 2017. T. 7, № 1.

98. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia / V. Elisashvili та ін. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008. T. 25, № 2. C. 331–339.

99. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes / G. Songulashvili та ін. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. T. 41, № 1-2. C. 57–61.

100. Moldes D., Lorenzo M., Sanromán M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology Letters*. 2004. T. 26, № 4. C. 327–330.

101. Decolorization of semisolid olive residues of “alperujo” during the solid-state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger* / F. Aloui та ін. *Biochemical Engineering Journal*. 2007. T. 35, № 2. C. 120–125.

102. Laccase production from *Trametes versicolor* in solid-state fermentation of steam-exploded pretreated cornstalk / A. E. Adekunle та ін. *Waste and Biomass Valorization*. 2016. T. 8, № 1. C. 153–159.

103. Adaptability of *Trametes versicolor* to the lignocellulosic inhibitors furfural, HMF, phenol and levulinic acid during ethanol fermentation / R. L. Kudahettige Nilsson та ін. *Biomass and Bioenergy*. 2016. T. 90. C. 95–100.

104. Press water from the mechanical drying of Douglas-fir wood chips has multiple beneficial effects on lignocellulolytic fungi / M. J. Reppke та ін. *Fungal Biology and Biotechnology*. 2022. T. 9, № 1.

105. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions / L. M. Hewitt та ін. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008. T. 27, № 3. C. 682.

106. Daugulis A. J., Bone D. H. Submerged cultivation of edible white-rot fungi on tree bark. *European Journal of Applied Microbiology*. 1977. T. 4, № 3. C. 159–166.

107. Production of lignocellulytic enzymes from spent mushroom compost of *Pleurotus eryngii* / S.-H. Lim та ін. *The Korean Journal of Mycology*. 2012. T. 40, № 3. C. 152–158.

108. Erkurt E. A., Ünyayar A., Kumbur H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*. 2007. T. 42, № 10. C. 1429–1435.

109. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes / E. Gomes та ін. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009. Т. 40, № 1. С. 31–39.

110. Levin L., Melignani E., Ramos A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*. 2010. Т. 101, № 12. С. 4554–4563.

111. Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization / L. Xu та ін. *Journal of Environmental Management*. 2020. Т. 270. С. 110904.

112. Singh J., Das A., Yogalakshmi K. N. Enhanced laccase expression and azo dye decolourization during co-interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *SN Applied Sciences*. 2020. Т. 2, № 6.

113. Preparation and optimisation of cross-linked enzyme aggregates using native isolate white rot fungi *Trametes versicolor* and *fomes fomentarius* for the decolourisation of synthetic dyes / M. Vrřanská та ін. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017. Т. 15, № 1. С. 23.

114. Comparison of two laccases from *Trametes versicolor* for application in the decolorization of dyes / Q. Li та ін. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014. Т. 24, № 4. С. 545–555.

115. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye / H. Hou та ін. *Process Biochemistry*. 2004. Т. 39, № 11. С. 1415–1419.

116. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators / E. Grassi та ін. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2011. Т. 65, № 4. С. 635–643.

117. Bisko N.A. et al. IBK Mushroom Culture Collection. Version 1.2. The IBK Mushroom Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany. M.G. Kholodny Institute of Botany, 2020.

118. Integrated Taxonomic Information System. URL: <https://www.itis.gov/>. (дата звернення: 11.05.2023).
119. Effect of tree species on enzyme secretion by the shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) / E. V. Plotnikov та ін. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2016. Т. 18, № 7. С. 637–644.
120. Buchalo A. S. Higher edible Basidiomycetes in pure culture. Kyiv : Naukova dumka, 1988. 144 с.
121. Effect of submerged cultivation conditions and inducers on biosynthesis of extracellular laccase by a *Trametes versicolor* 1666 strain / N. V. Shakhova та ін. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. Т. 47, № 9. С. 808–816.
122. Sequential solid-state and submerged cultivation of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* on biomass and the activity of lignocellulolytic enzymes / Q. An та ін. *BioResources*. 2016. Т. 11, № 4.
123. Дзигун Л. Особливості дереворуйнівного базидіомецета *Laetiporus sulphureus* (Bull. Fr.) Murrill в культурі. *Український ботанічний журнал*. 2004. Т. 61, № 1. С. 100–105.
124. Mycoremediation of Tunisian tannery wastewater under non-sterile conditions using *Trametes versicolor*: live and dead biomasses / R. Boujelben та ін. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022.
125. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. Lowry та ін. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Т. 193, № 1. С. 265–275.
126. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth) / N. Siddiqui та ін. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2017. Т. 12, № 4. С. 360–363.
127. Characterization and high-level expression of acidic endoglucanase in *Pichia pastoris* / A. Akbarzadeh та ін. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013. Т. 172, № 4. С. 2253–2265.
128. Ghose T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987. Т. 59, № 2. С. 257–268.

- 129.Chander M. An industrial dye decolourisation by *Phlebia* sp. *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*. 2015. T. 4. C. 217-226.
- 130.Zhang X., Flurkey W. H. Phenoloxidasen in *Portabella* mushrooms. *Journal of Food Science*. 1997. T. 62, № 1. C. 97–100.
- 131.Kurchenko I. M. Phenoloxidase activity of dark pigmented yeast-like fungi of *Aureobasidium* and *Hormonema* genera. *Studia Biologica*. 2015. T. 9, № 2. C. 13–22.
- 132.Sukarta I. N., Sastrawidana I. D. K. The use of agricultural waste to increase the production ligninolytic enzyme by fungus *Polyporus* sp. *OALib*. 2014. T. 01, № 03. C. 1–7.
- 133.Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate / D. B. Magalhães та ін. *Biotechnology Techniques*. 1996. T. 10, № 4. C. 273–276.
- 134.Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии. Москва: КолосС, 204. 296 с.
- 135.Practical Design and Data Analysis for Real Studies. *Statistical Methods in Biology*. 2014. P. 538–565. URL: <https://doi.org/10.1201/b17336-22>
- 136.Asgher M., Shah S. A. H., Iqbal H. M. N. Statistical correlation between ligninolytic enzymes secretion and remazol brilliant yellow-3gl dye degradation potential of *Trametes versicolor* IBL-04. *Water Environment Research*. 2016. T. 88, № 4. C. 338–345.
- 137.Закономірності росту перспективних об'єктів біотехнології – базидіоміцетів роду *Coriolus* у поверхневій культурі / І. Р. Клечак та ін. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2008. T. 6. C. 100–108.
- 138.R. Dulay R. M. Nutritional and physical requirements for mycelial growth and basidiocarp production of *Trametes elegans* from the Philippines. *Asian Journal of Agriculture and Biology*. 2021.

139. A comparison between some wood bark extracts: antifungal activity / Ö. Özgenç та иһ. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*. 2017. C. 502–508.
140. Agro-food waste employed to design and develop culture media for fungal growth / A. I. Grandes-Blanco та иһ. *Journal of Environmental Biology*. 2020. T. 41, № 2. C. 195–201.
141. Dawidowicz L., Siwulski M. Comparison of growth of mycelium of *Pleurotus cystidiosus* (Miller) on various agar media. *The Journal "Agriculture and Forestry"*. 2017. T. 63, № 1.
142. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts / A. Parenti та иһ. *Bioresource Technology*. 2013. T. 133. C. 142–149.
143. Tsujiyama S.-i. Effect of vanillin on the production of wood-decomposing enzymes from a wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. *Mycoscience*. 2003. T. 44, № 4. C. 345–350.
144. Zhu C. X., Hong F. Induction of an oxalate decarboxylase in the filamentous fungus *Trametes versicolor* by addition of inorganic acids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009. T. 160, № 2. C. 655–664.
145. Effect of different inducer sources on cellulase enzyme production by white-rot basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under submerged fermentation / O. Datsomor та иһ. *Fermentation*. 2022. T. 8, № 10. C. 561.
146. Lehto J. T., Alén R. J. Purification of hardwood-derived autohydrolysates. *BioResources*. 2012. T. 7, № 2.
147. Adekunle A. E., Guo C., Liu C.-Z. Lignin-enhanced laccase production from *Trametes versicolor*. *Waste and Biomass Valorization*. 2016. T. 8, № 4. C. 1061–1066.
148. Optimization of simultaneous production of tyrosinase and laccase by *Neurospora crassa* / S. M. Moshtaghioun та иһ. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2017. T. 35, № 1. C. 1–10.

149. Improved efficiency in screening for lignin-modifying peroxidases and laccases of basidiomycetes / A. Kinnunen та ін. *Current Biotechnology*. 2017. Т. 6, № 2. С. 105–115.

150. Effects of mediators for ligninolytic enzyme production and kinetic studies on degradation of pentachlorobenzene by *Trametes versicolor* U80 / A. A. Sari та ін. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2016. Т. 227, № 9.

151. Scale-up laccase production from *Trametes versicolor* stimulated by vanillic acid / K.-F. Wang та ін. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016. Т. 39, № 7. С. 1041–1049.

152. Additive effects of CuSO₄ and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 using sucrose as a carbon source / F. Bettin та ін. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2014. Т. 31, № 2. С. 335–346.

153. Koutrotsios G., Zervakis G. I. Comparative Examination of the Olive Mill Wastewater Biodegradation Process by Various Wood-Rot Macrofungi. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. P. 1–14.

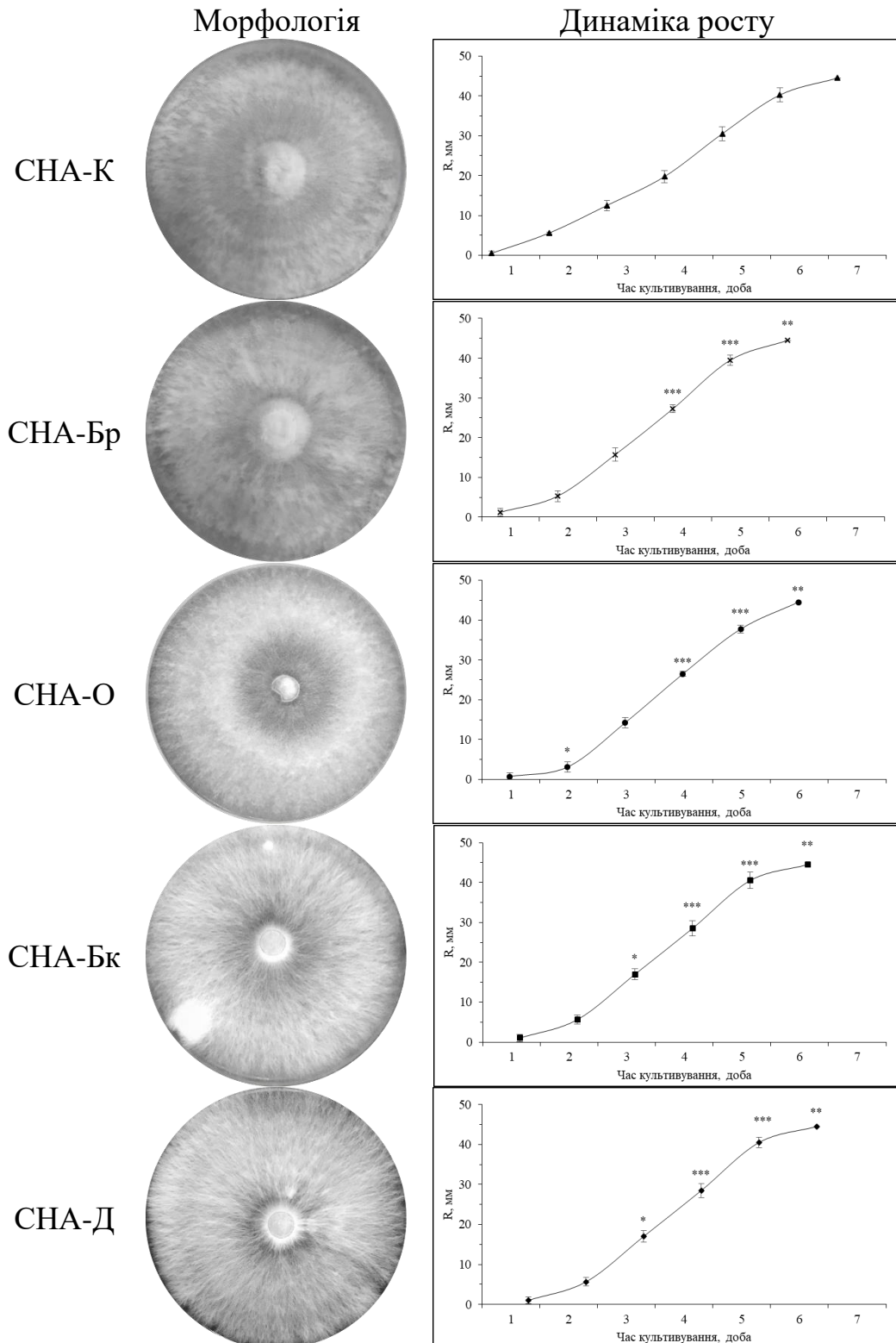
154. Decolorization of three acid dyes by enzymes from fungal strains / C. Park та ін. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2004. Т. 14. С. 1190–1195.

155. Saetang J., Babel S. Effect of glucose on enzyme activity and color removal by *Trametes versicolor* for high strength landfill leachate. *Water Science and Technology*. 2010. Т. 62, № 11. С. 2519–2526.

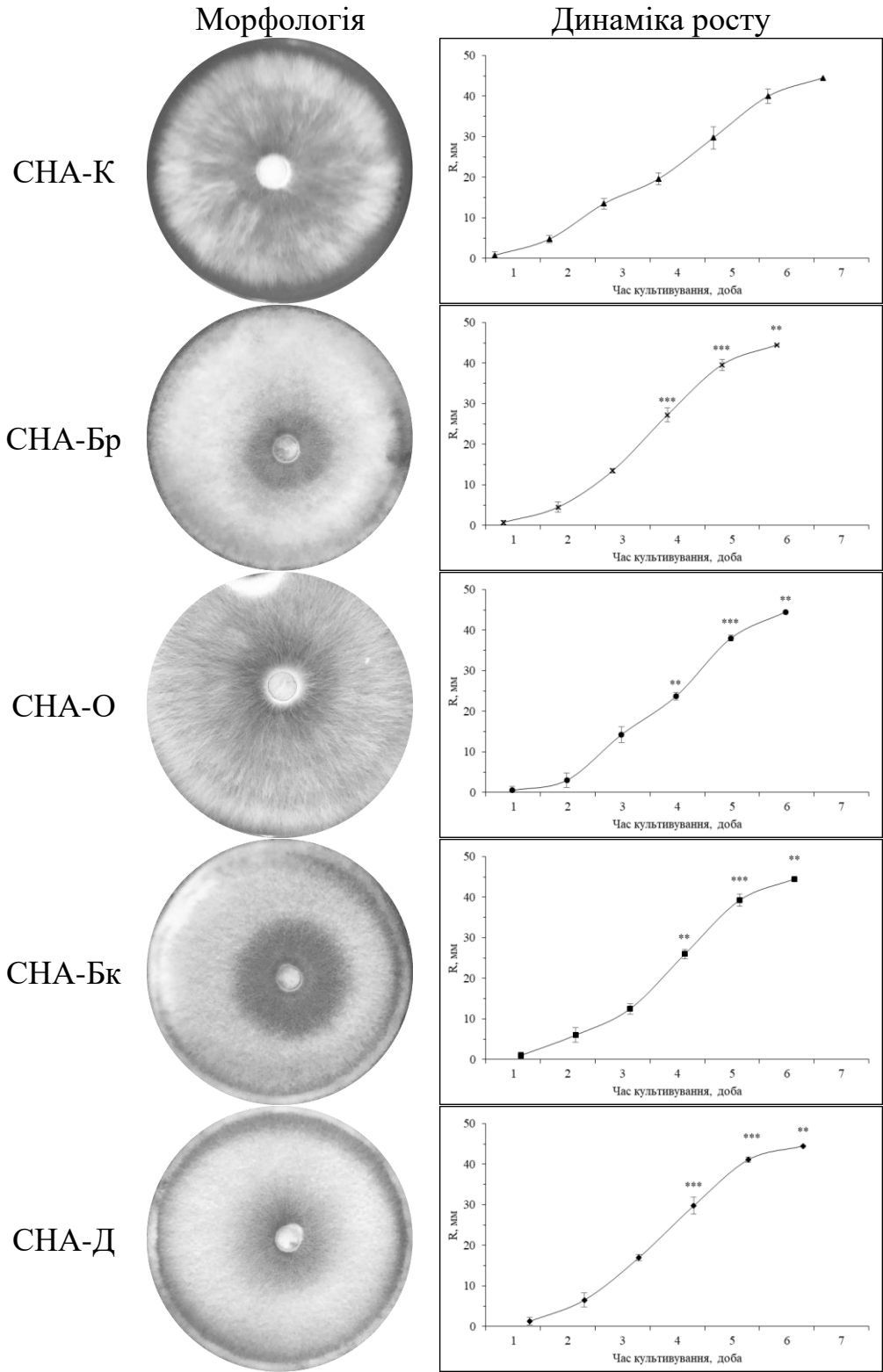
Додаток А

Вплив агаризованих середовищ на ростові показники досліджуваних штамів

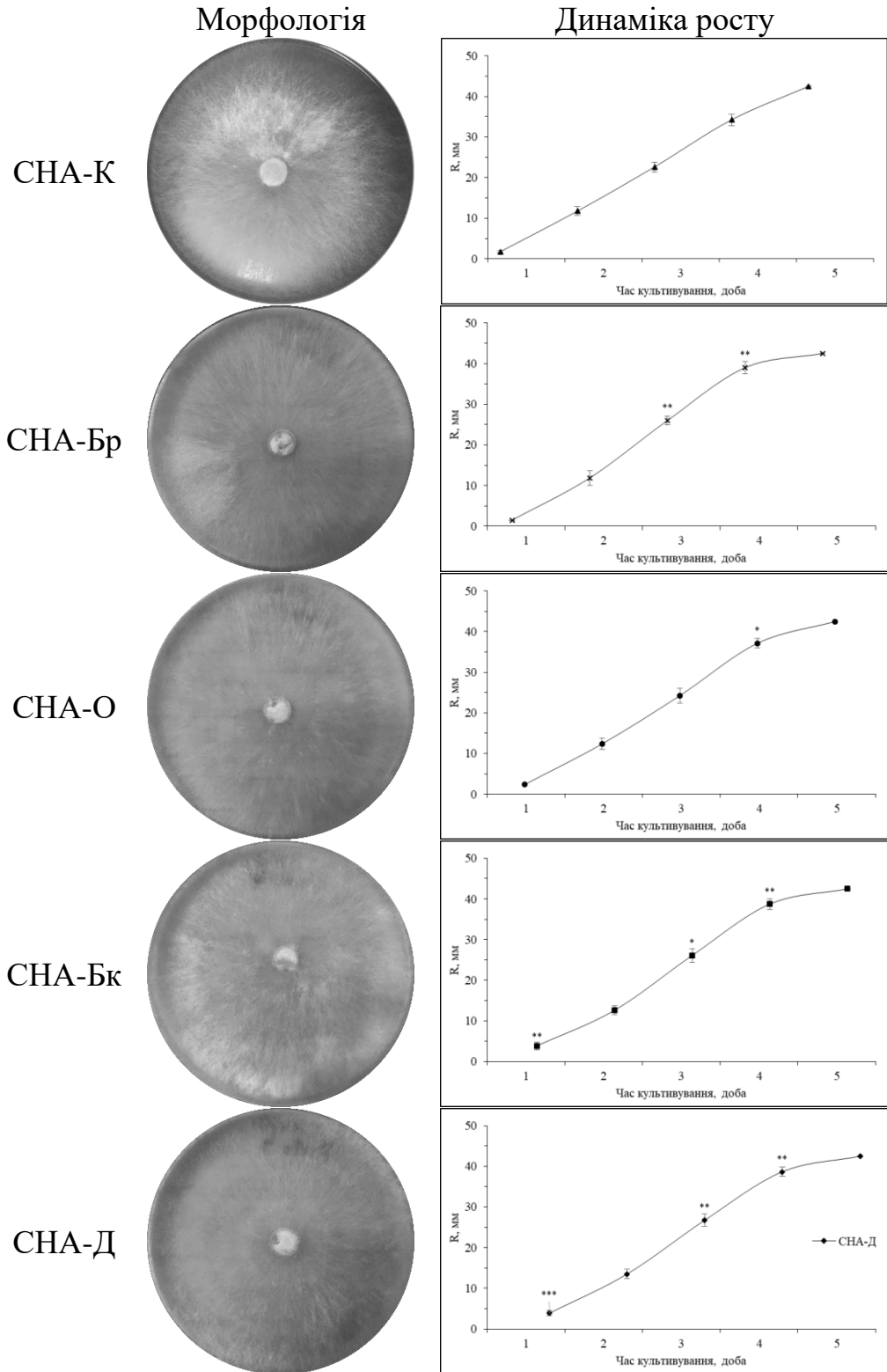
Таблиці А.1. Морфологія та динаміка росту штамів *P. ostreatus* 8 на досліджуваних середовищах



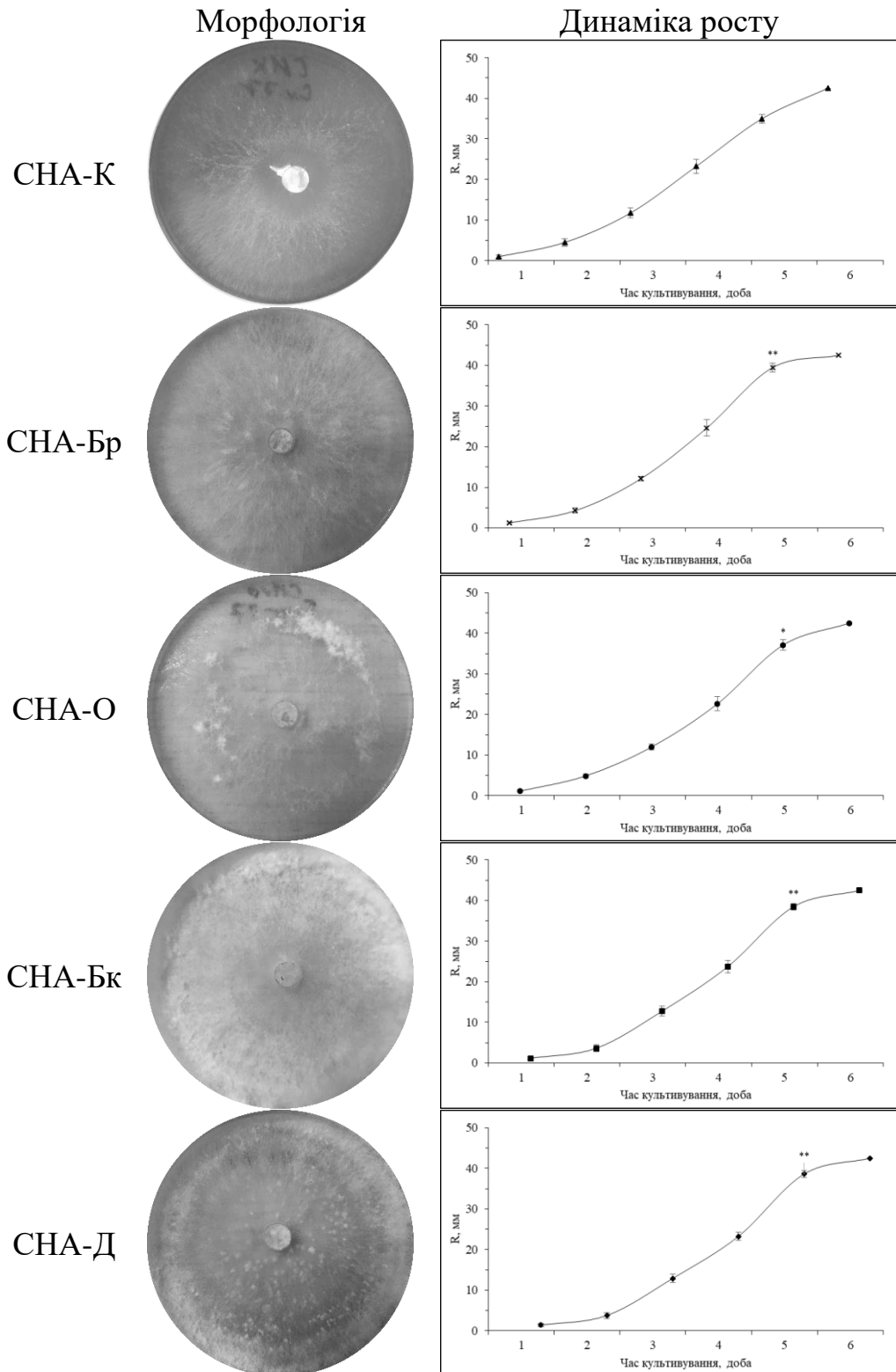
Таблиця А.2. Морфологія та динаміка росту штамів *P. ostreatus* 12 на досліджуваних середовищах



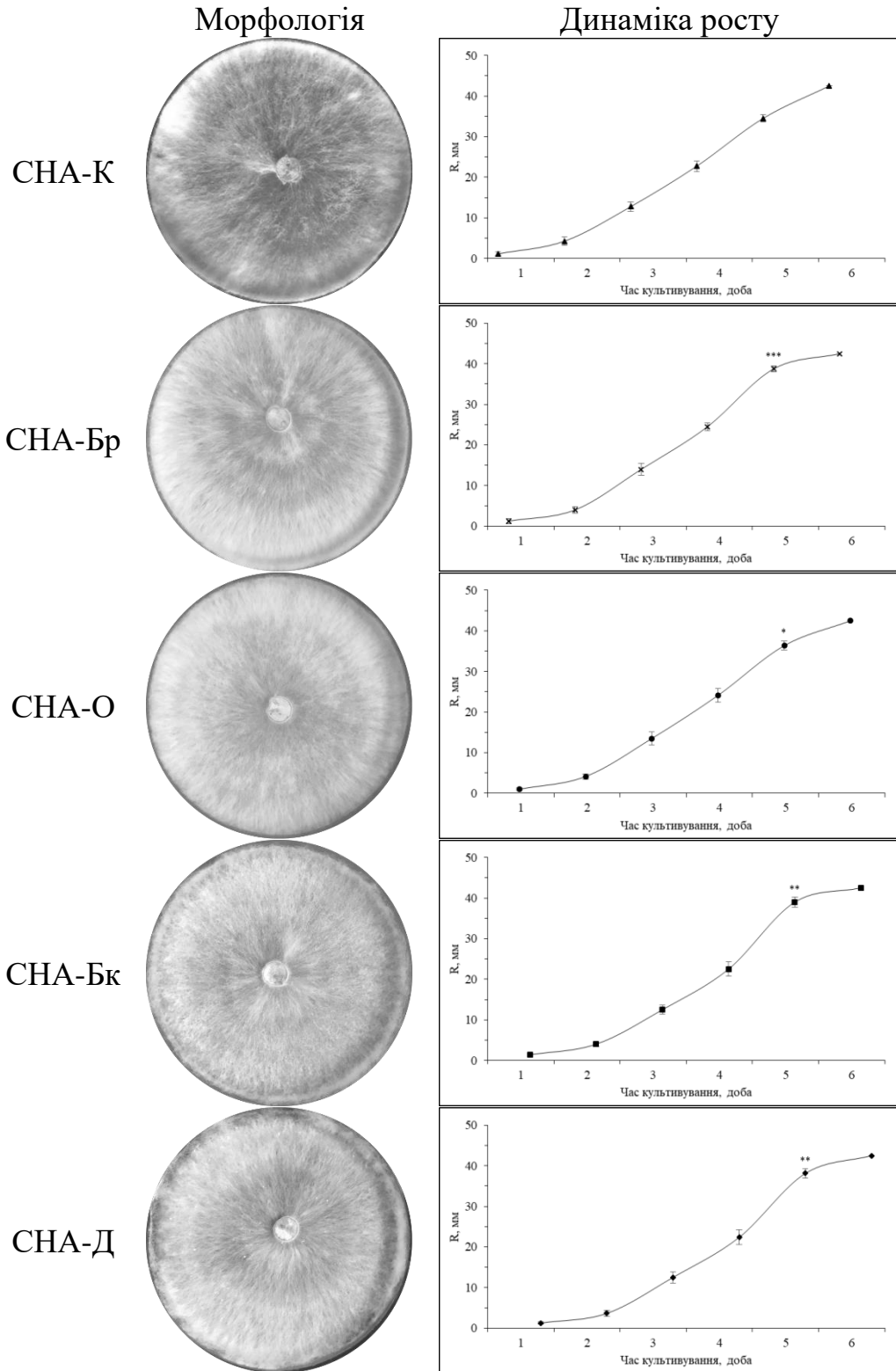
Таблиця А.3. Морфологія та динаміка росту штамів *T. versicolor* 353 на досліджуваних середовищах



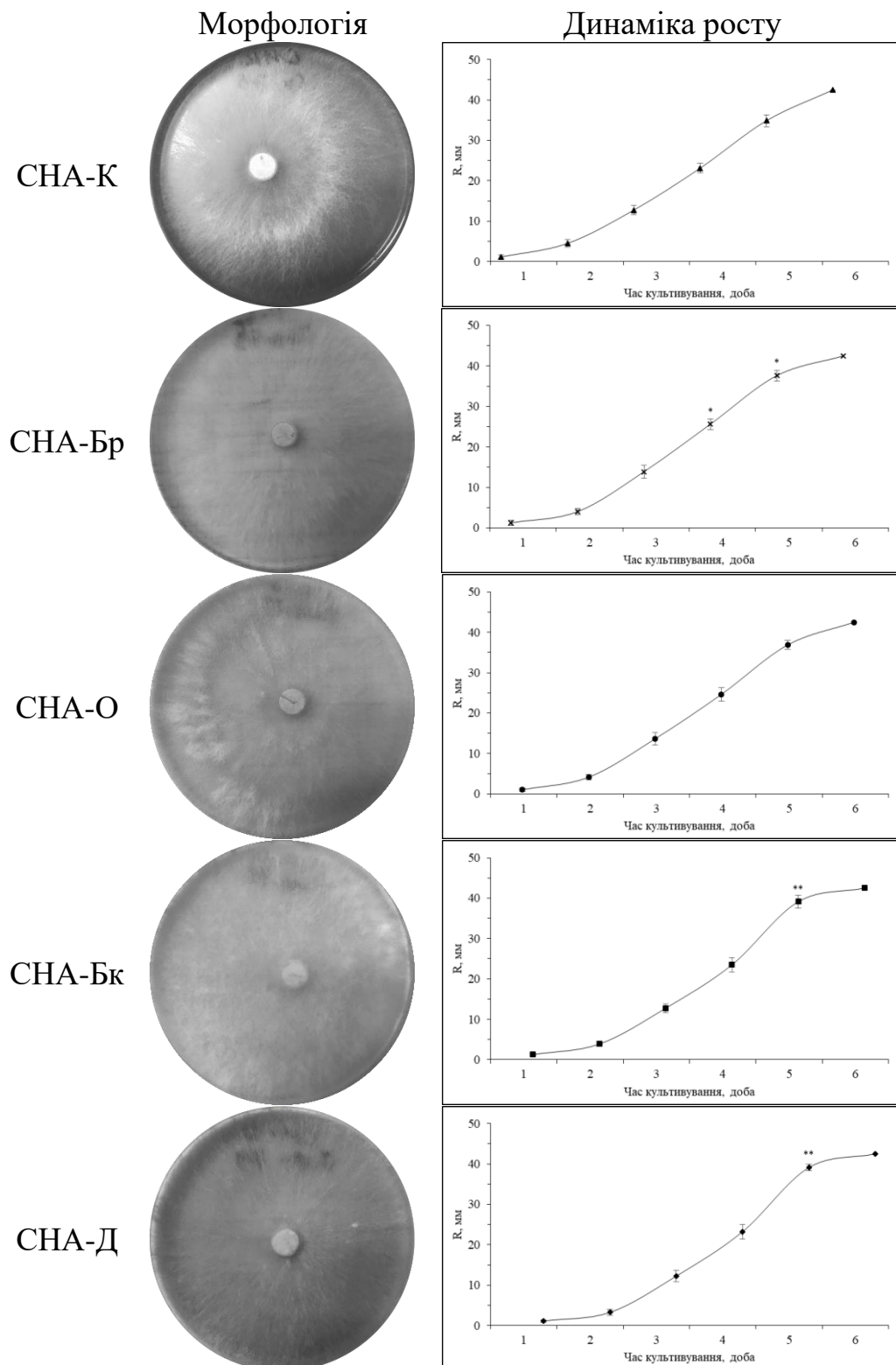
Таблиця А.4. Морфологія та динаміка росту штамів *T. versicolor* 1689 на досліджуваних середовищах



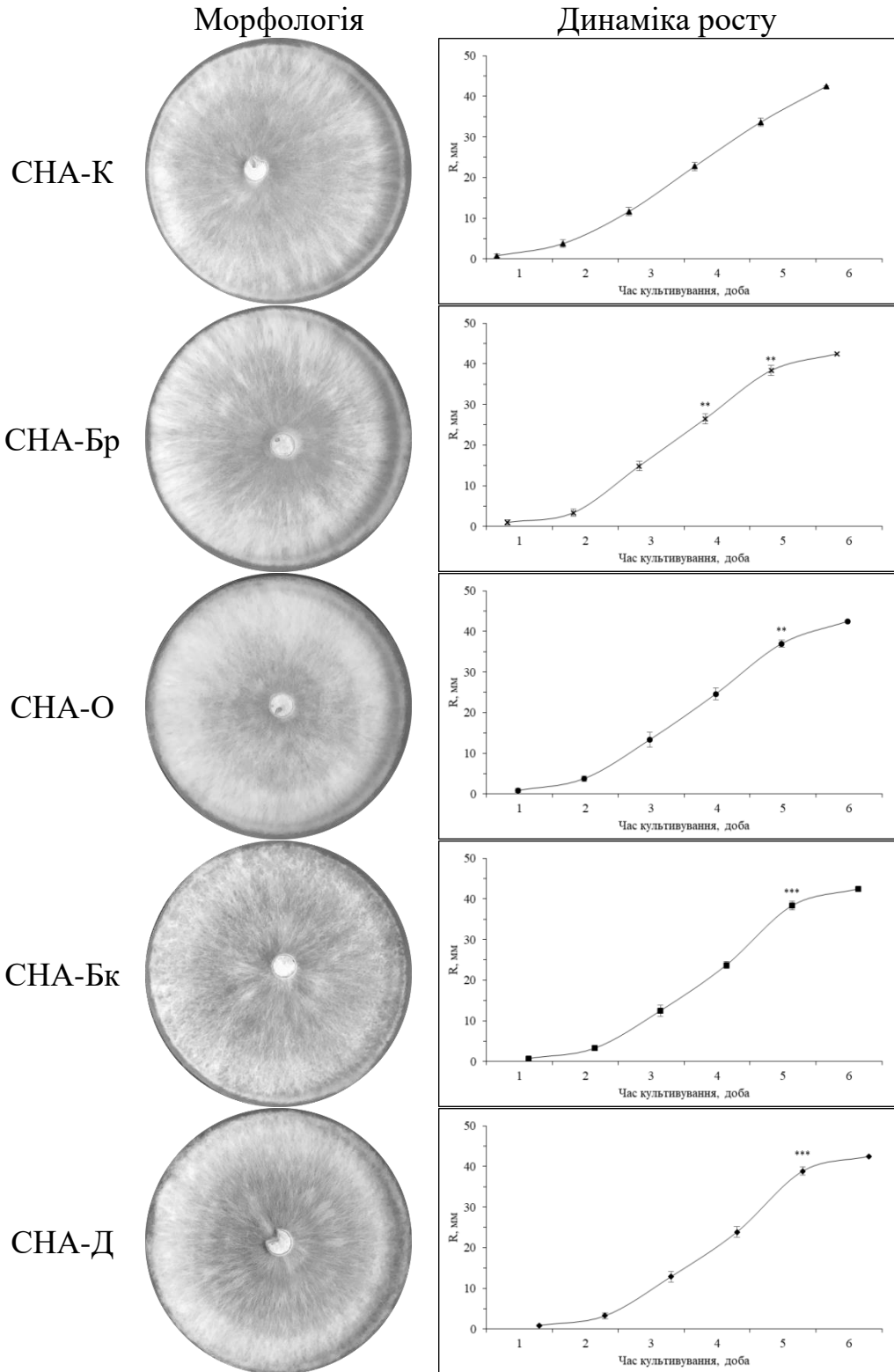
Таблиця А.5. Морфологія та динаміка росту штамів *T. versicolor* 5094 на досліджуваних середовищах



Таблиця А.6. Морфологія та динаміка росту штамів *T. versicolor* 5095 на досліджуваних середовищах



Таблиця А.7. Морфологія та динаміка росту штамів *T. versicolor* 5299 на досліджуваних середовищах



Додаток Б
Продуктивність синтезу ферментів на рідких середовищах

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Додаток В

Аналіз закономірностей синтезу ферментів

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації

Отримані результати готуються до публікації