

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики**

«На правах рукопису»  
УДК \_\_\_\_\_

«До захисту допущено»

В.о. завідувача кафедри  
\_\_\_\_\_ Кузьмінський Є.В.

“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2020р.

## **Магістерська дисертація**

**на здобуття ступеня магістра**

**за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»**

**зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»,**

(код і назва)

**на тему: Підбір складу мікробного угруповання препарату для деструкції  
рослинних відходів**

Виконала: студентка II курсу, групи БЕ-91мп  
(шифр групи)

Спатару Катерина Вадимівна  
(прізвище, ім'я, по батькові)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Науковий керівник к.т.н., асист. Зубченко Людмила Сергіївна  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Консультант Розробка

стартап-проєкту к.е.н., доц. Ткаченко Тетяна Петрівна  
(назва розділу) (науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Рецензент к.т.н., доц. Трус Інна Миколаївна

(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

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

Студент \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2020 року

**Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут  
імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)  
Освітньо-професійна програма «Біотехнології»  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»,

ЗАТВЕРДЖУЮ  
В.о. завідувача кафедри  
\_\_\_\_\_ Є.В.Кузьмінський  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020р.

**ЗАВДАННЯ**  
на магістерську дисертацію студентці  
**Спатару Катерині Вадимівні**  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема дисертації: **«Підбір складу мікробного угруповання препарату для деструкції рослинних відходів»**,  
науковий керівник дисертації к.т.н., асист. Зубченко Людмила Сергіївна,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом по університету від «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р. № \_\_\_\_\_

2. Термін подання студентом дисертації \_\_\_\_\_

3. Об'єкт дослідження: процес мікробіологічної деструкції целюлози

4. Предмет дослідження: склад угруповання мікроорганізмів-деструкторів целюлози

5. Перелік завдань, які потрібно розробити:

- 1) Навести характеристику мікроорганізмів-деструкторів целюлози;
- 2) Описати біохімічні основи деструкції целюлози;
- 3) Провести дослідження на виявлення активності целюлозолітичних ферментів у обраних мікроорганізмів-деструкторів;
- 4) Здійснити мікроскопію мікроорганізмів з найбільшою ферментативною активністю та описати їх морфологічні особливості;
- 5) Розробити стартап-проект.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: плакати формату А1:

1. Результати визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом; 2. Результати визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов; 3. Результати визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів; 4. Результати візуального визначення ефективності деструкції целюлози; 5. Калькуляція собівартості стартап-продукту.

7. Орієнтовний перелік публікацій: заплановано написання тез за темою «Встановлення оптимального мікробного складу препарату-деструктора целюлози (рослинних решток)».

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розроблення стартап-проекту	Ткаченко Т.П., к.е.н., доцент		

9. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Літературний пошук інформації щодо характеристики мікроорганізмів, здатних до деструкції целюлози	До 01.11.2019	
2	Проведення визначення ваговим методом целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов	01.11.2019-01.03.2020	
3	Дослідження целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом	01.03.2020-03.05.2020	
4	Дослідження спектрофотометричним методом КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів	03.05.2020-15.06.2020	
5	Визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату візуальним методом	15.09.2020-1.11.2020	
6	Вивчення морфологічних ознак мікроорганізмів-деструкторів методом світлової мікроскопії	1.11.2020-15.11.2020	
7	Розроблення стартап-проекту	01.09.2020-01.10.2020	
8	Формулювання висновків та оформлення магістерської дисертації	до 01.12. 2020	

Студентка \_\_\_\_\_

(підпис)

(ініціали, прізвище)

Науковий керівник дисертації \_\_\_\_\_

(підпис)

(ініціали, прізвище)

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація: 111 с., 39 табл., 29 рис., 35 джерел

Актуальність роботи полягає в тому, що на сьогодні велика кількість рослинних відходів утилізується неправильно, що призводить до негативних екологічних та економічних наслідків. Використання для деструкції рослинних решток мікробних препаратів є обґрунтованою альтернативою звичним методам.

Тому метою роботи було підібрати склад мікробного угруповання препарату для деструкції рослинних відходів на основі целюлозолітичної активності.

Завданнями дослідження було:

- 1) Описати біохімічні основи деструкції целюлози;
- 2) Навести характеристику мікроорганізмів-деструкторів целюлози;
- 3) Провести дослідження на виявлення активності целюлолітичних ферментів у обраних мікроорганізмів-деструкторів;
- 4) Здійснити мікроскопію мікроорганізмів з найбільшою ферментативною активністю та описати їх морфологічні особливості;
- 5) Розробити стартап-проект.

Об'єкт дослідження: процес мікробіологічної деструкції целюлози.

Предмет дослідження: целюлозолітична активність мікроорганізмів-деструкторів целюлози при різному складі мікробних угруповань.

В роботі застосовано такі методи дослідження: визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом; ваговий метод визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов; спектрофотометричний метод визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів; візуальний метод визначення

ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату; мікроскопічний метод дослідження морфологічних ознак мікроорганізмів; для обробки результатів використовували програмне забезпечення MS Excel та ImageJ.

Наукова новизна: вперше досліджено целюлолітичну активність для суміші грибів та мікроорганізмів при сумісному культивуванні. Встановлено, що сумісне культивування призводить до зниження целюлолітичної активності грибів при використанні розчинних форм целюлози як субстрату, на відміну від нерозчинних форм целюлози.

Практичне значення: на основі результатів визначення целюлолітичної активності мікроорганізмів та їх штучно створених асоціацій встановлено, що для створення мікробних препаратів для біодеградації рослинних решток доцільно використовувати міксоміцети *Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum* в суміші.

Апробація результатів дисертації. Результати, які включені до дисертації оприлюднені та опубліковані в збірках наступних конференцій:

Спатару К.В. Встановлення оптимального мікробного складу препарату-деструктора целюлози (рослинних решток)/ К.В. Спатару, Л.С. Зубченко// Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (Київ, 20 травня 2020) – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во «Політехніка», 2020. – 186 с.

ДЕСТРУКЦІЯ ЦЕЛЮЛОЗИ, БІОДЕГРАДАЦІЯ, ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНИЙ  
КОМПЛЕКС, АКТИВНІСТЬ ЦЕЛЮЛАЗ, ГІДРОЛІЗ КЛІТКОВИНИ

## ABSTRACT

Master's dissertation: 111 pp., 39 tables, 29 figures, 35 sources

The relevance of the master's dissertation is due to the fact that today a large amount of plant waste is disposed of incorrectly way, which leads to negative environmental and economic consequences. The use of microbial preparations for the destruction of plant remains is a reasonable alternative to conventional methods.

Therefore, the aim of the work was to determine and select the composition of the microbial group of the preparation for the destruction of plant waste.

The objectives of the study were:

- 1) To give the characteristics of microorganisms-destroyers of cellulose;
- 2) To describe the biochemical basis of cellulose destruction;
- 3) To conduct research to detect the activity of cellulolytic enzymes in selected microorganisms-destructors;
- 4) To carry out microscopy of microorganisms with the greatest enzymatic activity and describe their morphological features;
- 5) To develop a startup project.

Object of the research: the process of microbiological destruction of cellulose.

Subject of the research: cellulolytic activity of microorganisms-destroyers of cellulose at different structure of microbic groups.

The following research methods were used in the work: determination of cellulolytic activity of microorganisms by the hole method; weight method for determining cellulolytic activity by simulating field conditions; spectrophotometric method for determining CMC activity in the studied species of microorganisms; visual method for determining the efficiency of destruction of cellulose by microorganisms using paper material as a substrate;

microscopic method of studying morphological features of microorganisms; MS Excel and ImageJ software were used to process the results.

Scientific novelty: cellulolytic activity for a mixture of fungi and microorganisms in co-cultivation was studied for the first time. It was found that co-cultivation leads to a decrease in the cellulolytic activity of fungi when using soluble forms of cellulose as a substrate, in contrast to insoluble forms of cellulose.

Practical significance: based on the results of determining the cellulolytic activity of microorganisms and their artificial associations, it was found that to create microbial preparations for biodegradation of plant residues, it is advisable to use myxomycetes *Trichoderma viride* and *Chaetomium globosum* in the mixture. Approbation of dissertation results. The results of this thesis were partially presented at the following conferences:

Спатару К.В. Встановлення оптимального мікробного складу препарату-деструктора целюлози (рослинних решток)/ К.В. Спатару, Л.С. Зубченко// Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 20 травня 2020) – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во «Політехніка», 2020. – 186 с.

CELLULOSE DESTRUCTION, BIODEGRADATION, CELLULOLYTIC COMPLEX, CELLULASE ACTIVITY, FIBER HYDROLYSIS

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК ПРИЙНЯТИХ СКОРОЧЕНЬ.....	10
ВСТУП .....	11
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ-ДЕСТРУКТОРІВ ЦЕЛЮЛОЗИ .....	13
1.1 Біохімічні основи деструкції целюлози мікроорганізмами .....	13
1.2 Характеристика мікроорганізмів, що здатні до деструкції целюлози	19
1.2.1 Бактерії-деструктори целюлози .....	19
1.2.2. Гриби-деструктори целюлози.....	24
1.3 Фактори навколишнього середовища, що впливають на процес деструкції .....	29
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУВАЛИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЦЕЛЮЛАЗ МІКРООРГАНІЗМІВ-ДЕСТРУКТОРІВ ЦЕЛЮЛОЗИ .....	34
2.1 Визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом. ....	34
2.2 Метод обрахунку діаметра зони просвітлення за допомогою програми ImageJ .....	37
2.3 Ваговий метод визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов.....	37
2.4 Спектрофотометричний метод визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів.....	40
2.5 Візуальний метод визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату.	44
2.6 Мікроскопічний метод визначення морфологічних ознак досліджуваних мікроорганізмів.....	46
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	47

3.1	Результати визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом.....	47
3.2	Результати визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов .....	49
3.3	Побудова калібрувального графіка для визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів.....	56
3.4	Результати визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів .....	57
3.5	Результати візуального визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату. 61	
3.6	Морфологічні ознаки обраних мікроорганізмів .....	67
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБЛЕННЯ СТАРТАП-ПРОЄКТУ .....		74
4.1	Резюме .....	74
4.2	Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу .....	78
4.3	Визначення ключових факторів успіху проєкту.....	81
4.4	Визначення потенційних споживачів .....	83
4.5	Ціна інноваційної пропозиції на ринку .....	87
4.6	Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів .....	94
4.7	Ризики стартап-проєкту та методи управління ними.....	98
РОЗДІЛ 5. ВИМОГИ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ І ОХОРОНИ ПРАЦІ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ.....		102
ВИСНОВКИ.....		103
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		105
ДОДАТОК А.....		110

## **ПЕРЕЛІК ПРИЙНЯТИХ СКОРОЧЕНЬ**

МПА – м'ясо-пептонний агар

КМЦ – карбоксиметилцелюлоза

ПС – поживне середовище

РР – редукуючі речовини

## ВСТУП

**Актуальність теми:** Одним з відходів сільського господарства є рослинні рештки, які є джерелом надходження органічних речовин в ґрунт. Такі рослинні відходи стають причиною багатьох проблем: розмноження фітопатогенних мікроорганізмів та шкідників, ускладнення роботи обладнання. Намагання позбутися від них призводять до ще більш серйозних наслідків: спалювання призводить до збіднення ґрунтової мікрофлори, виникнення неконтрольованих пожеж та виникнення інших екологічних проблем; закопування подрібненої соломи в ґрунт небезпечно через зимування на ній різноманітної мікрофлори, що активує процеси іммобілізації ґрунтового азоту. Основною складовою рослинних відходів є целюлоза – полімер, який дуже важко піддається гідролізу. Тому на сьогодні є важливою розробка сучасних біопрепаратів, що будуть не лише розкладати рослинні відходи (головним чином, целюлозу), а й попереджати розвиток на них фітопатогенної мікрофлори.

**Мета роботи:** підібрати склад мікробного угруповання препарату для деструкції рослинних відходів на основі їх целюлозолітичної активності.

Для досягнення мети було поставлено нижче наведені **завдання:**

- 1) Описати біохімічні основи деструкції целюлози;
- 2) Навести характеристику мікроорганізмів-деструкторів целюлози;
- 3) Провести експериментальну оцінку активності целюлолітичних ферментів у обраних мікроорганізмів-деструкторів;
- 4) Здійснити мікроскопічний аналіз мікроорганізмів з найбільшою ферментативною активністю та описати їх морфологічні особливості;
- 5) Розробити стартап-проект.

**Об'єкт дослідження:** процес мікробіологічної деструкції целюлози.

**Предмет дослідження:** целюлозолітична активність мікроорганізмів-деструкторів целюлози при різному складі мікробних угруповань.

**Методи дослідження:** визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом; ваговий метод визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов; спектрофотометричний метод визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів; візуальний метод визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату; мікроскопічний метод дослідження морфологічних ознак мікроорганізмів; для обробки результатів використовували програмне забезпечення MS Excel та ImageJ.

**Наукова новизна:** вперше досліджено целюлолітичну активність для суміші грибів та мікроорганізмів при сумісному культивуванні. Встановлено, що сумісне культивування призводить до зниження целюлолітичної активності грибів при використанні розчинних форм целюлози як субстрату, на відміну від нерозчинних форм целюлози.

**Практичне значення:** на основі результатів визначення целюлолітичної активності мікроорганізмів та їх штучно створених асоціацій встановлено, що для створення мікробних препаратів для біодеградації рослинних решток доцільно використовувати міксоміцети *Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum* в суміші.

**Апробація результатів дисертації.** Результати, які включені до дисертації, оприлюднені та опубліковані в збірках наступних конференцій:

Спатару К.В. Встановлення оптимального мікробного складу препарату-деструктора целюлози (рослинних решток)/ К.В. Спатару, Л.С. Зубченко// Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 20 травня 2020) – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, вид-во «Політехніка», 2020. – 186 с.

# РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ- ДЕСТРУКТОРІВ ЦЕЛЮЛОЗИ

## 1.1 Біохімічні механізми деструкції целюлози мікроорганізмами

Целюлоза – це нерозчинний полісахарид, що в природних умовах утворює зв'язки з іншими сполуками, а саме з геміцелюлозою, лігніном, таніном та іншими речовинами. Молекули целюлози – це мікрофібрили, на поверхні яких відбувається адсорбція інших сполук. Ці мікрофібрили поєднуються в пучки, що покриваються оболонкою, яка складається з воску та пектину.

На рисунку 1.1 зображена лінійна полімерна молекула целюлози, елементарною одиницею якої є  $\alpha$ -D-глюкоза із ступенем полімеризації близько 14 000 і молекулярною масою приблизно 500 000. Довжина молекули та кількість глікозидних залишків може варіювати. Такі лінійні молекули поєднуються водневими зв'язками, що робить целюлозу розчинною, гігроскопічною та реакційно здатною[1].

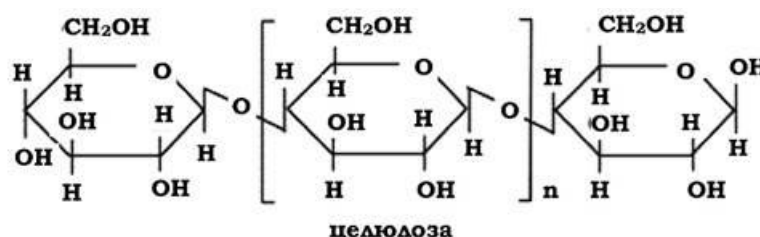


Рисунок 1.1 –Хімічна структура молекули целюлози

Фізичні властивості целюлози: нерозчинна у воді та органічних розчинниках біла волокниста речовина. Целюлозу здатен розчинити тільки реактив Швейцера  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{OH})_2$  (амоніачний розчин купрум(II) гідроксиду).

Є основною складовою частиною оболонок рослинних клітин. Найбільше її у волокнах бавовни (до 98%), льону та коноплі. У деревині целюлози 50%[11].

В природі целюлозу розкладає велика кількість мікроорганізмів. Саме вони мають велику кількість ферментів та ферментних систем, що забезпечують активну деградацію такої стійкої сполуки. Цей процес необхідний мікроорганізмам з метою розщеплення целюлози до глюкози, яка потім використовується в якості джерела енергії.

Целюлозолітичні ферменти належать до класу гідролаз, вони каталізують гідроліз  $\beta(1,4)$ -глікозидних зв'язків целюлози, в результаті чого утворюється глюкоза та дисахарид целобіоза [2].

Целюлази належать до глікозидаз, тобто розщеплюють глікозидний зв'язок, гідролізуючи оліго- та полісахариди, а також деякі з них здатні переносити глікозидний залишок на молекулу акцептора [3].

Більшість целюлаз є мультидоменними білками, що мають як мінімум 3 функціонально відмінних структурних елементи: каталітичний домен, целюлозозв'язуючий домен та лінкер, що їх поєднує [4].

Комплекс целюлозолітичних ферментів (рисунок 1.2) мікроорганізмів здійснює перетворення целюлози до розчинних продуктів. Власне сам комплекс складається з ферментів, що розрізняються за своєю специфічністю, а саме:

- ендо-1,4- $\beta$ -глюканази;
- екзо-целобіогідролази;
- екзо-1,4- $\beta$ -глюкозидази;
- целобіази [5].

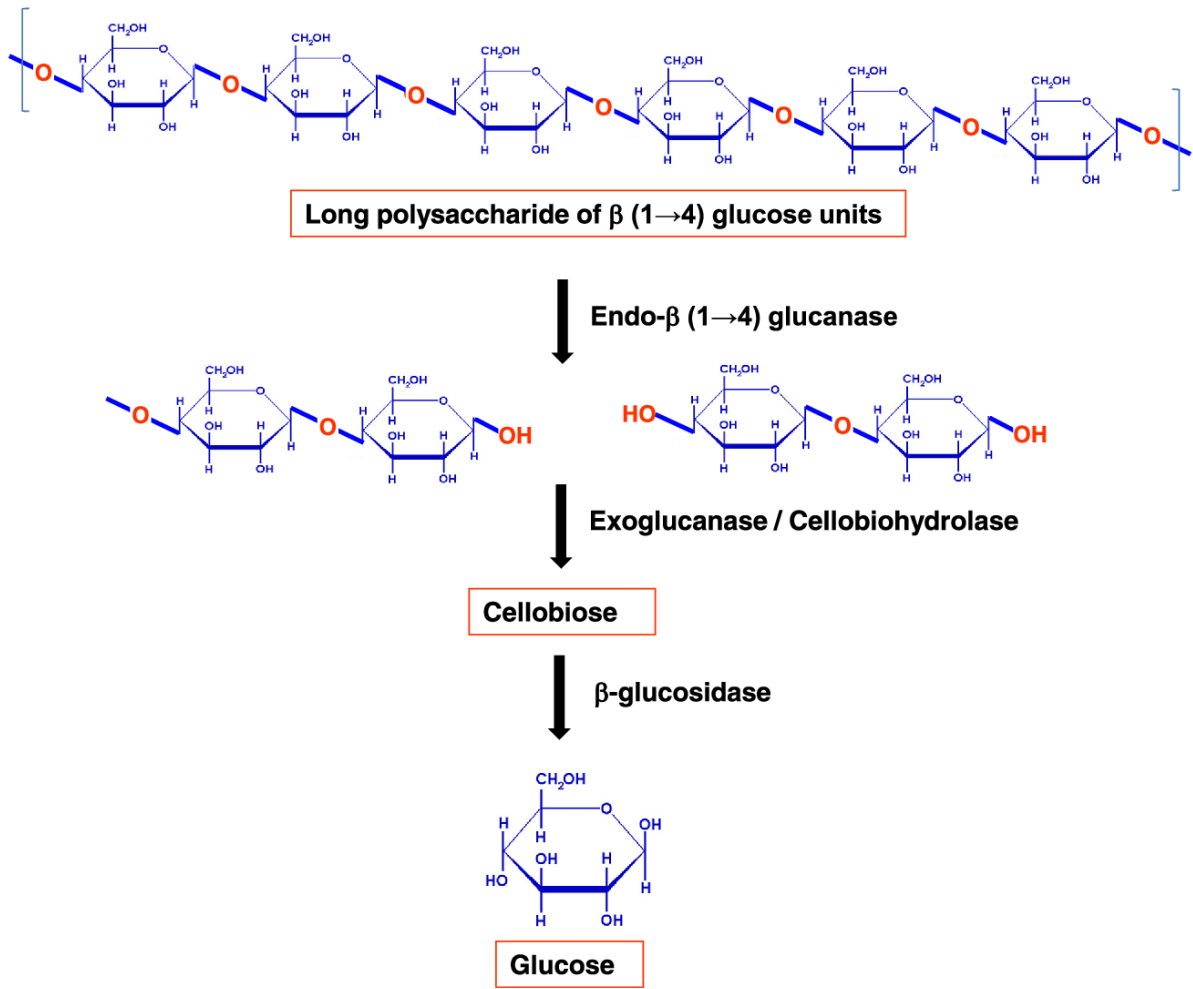


Рисунок 1.2 – Ферменти, що беруть участь у розщепленні целюлози [33]

Спільна дія цих ферментів зображена на рисунку 1.3. Дана схема показує загальну послідовність реакції розкладання природної целюлози ферментами.

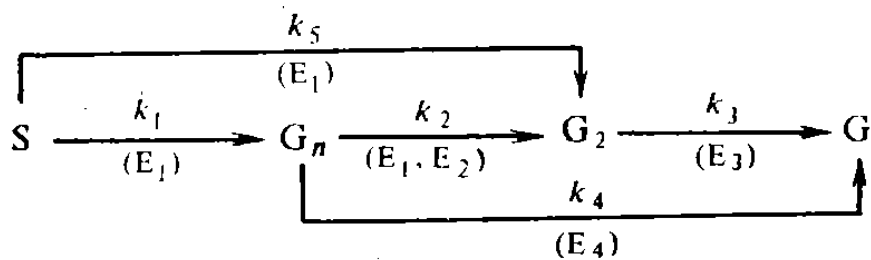


Рисунок. 1.3 – Загальна схема дії целюлозолітичних ферментів на целюлозу: E1 – ендоглюканаза; S – субстрат; G<sub>n</sub> – целоолігосахариди різного ступеню полімеризації; G<sub>2</sub> – целобіоза; E2 – целобіогідролаза; G – глюкоза; E3 – целобіаза; E4 – екзоглюкозидаза

Ендоглюканаза (E1) взаємодіє з нерозчинним субстратом (целюлозою S), що стає причиною утворення целоолігосахаридів різного ступеню поляризації G<sub>n</sub> та целобіози G<sub>2</sub>. Остання також утворюється як проміжний продукт дії целобіогідролази (E2). Наступним етапом є гідроліз целобіози до глюкози G під дією целобіази (E3). В свою чергу, фермент екзоглюкозидаза (E4) перетворює проміжні целоолігосахариди безпосередньо в глюкозу [6].

Проте, перед гідролітичною стадією ферментам потрібно адсорбуватися на поверхні нерозчинного субстрату. Порівнюючи швидкості протікання обох етапів, можна сказати, що швидкість гідролізу значно менша за швидкість адсорбції, тобто перенос ферментів до поверхні субстрату не є лімітуючою стадією процесу гідролізу целюлози [5].

Розібравшись в загальній дії целюлозолітичного комплексу варто зупинитися на особливостях кожного ферменту, що входить до його складу.

**Ендо-1,4-β-глюканази** гідролізують внутрішні зв'язки, що віддалені від кінців полімерного ланцюга з утворенням целоолігосахаридів, що супроводжується зменшенням ступеня поляризації целюлози. Існують

ендоглюконази різного ступеня впорядкованості дії: менш впорядкованої та більш впорядкованої. Перші різко зменшують ступінь поляризації завдяки тому, що їх дія поширюється лише на утворення олігосахаридів, а моно- та дисахариди не утворюються. Ендоглюконази більш впорядкованої дії одночасно з деполімеризацією відщеплюють моно-, ди- та трисахариди.

Особливістю дії ендоглюканази є збільшення їх активності зі збільшенням ступеня полімеризації вихідного субстрату, а, відповідно, і довжини олігосахариду. В більшості випадків, ендоглюканази не здатні гідролізувати целоолігосахариди зі ступенем поляризації менше 4.

Оптимальними умовами для дії ендоглюканаз є кисле або нейтральне середовище (рН в інтервалі від 2,5 до 7,0) при температурі від 30 до 75 °С.

Ендоглюканазі властива висока активність відносно карбоксиметилцелюлози, але для кристалічної целюлози – навпаки низька [5].

Ендоглюканази діють на ланцюжки глюкози в різних випадкових місцях, що призводить до утворення нових реакційноздатних центрів для деполімеризуючої дії целобіогідролаз на кінці ланцюгів [7].

**Целобіогідролази** – це ферменти, що здійснюють відщеплення целобіози та глюкози в процесі гідролізу целюлози або целоолігосахаридів. Вони є специфічними до  $\beta$ -1-4-глікозидному зв'язку.

Молекулярна маса близько 30 – 70 кДа, оптимум рН також лежить в кислій області.

Целобіогідролаза, на відміну від ендоглюканази, не здатна гідролізувати карбоксиметилцелюлозу [8].

Дія **екзоглюкозидаз** полягає у відщепленні залишків глюкози від кінців молекули целюлози (природньої чи частково гідролізованої) [5].

Основною відмінністю екзоглюкозидаз від целобіогідролаз є те, що основним продуктом їх дій на целюлозу чи целоолігосахариди є не ди-, а моносахариди [8].

**Целобіази** – це різновид  $\beta$ -глюкозидаз, що мають вузьку специфічність та здійснюють гідроліз целобіози до глюкози. Проте деякі мікроорганізми здатні синтезувати целобіазу, що гідролізує також олігосахариди з вищим ступенем поляризації. Мають високу молекулярну масу, що коливається від 120 до 180 кДа [9].

В процесі ферментативного гідролізу целюлози важливою складовою є збалансованість компонентів целюлазного комплексу та їх активність (власне кількісний та якісний склад целюлазного комплексу). Такий гідролітичний комплекс, перш за все, має включати: а) ферменти, що здійснюють глибокий гідроліз целюлози (ендоглюканази та целобіогідролази); б) ферменти, що здійснюють конверсію проміжного продукту – целобіози в глюкозу.

Також однією з характерних особливостей целюлозолітичного комплексу є наявність синергізму (синергізм – це явище взаємного підсилення швидкості гідролізу целюлози до кінцевих продуктів при сумісній дії компонентів целюлазного комплексу порівняно з сумою індивідуальних дій цих компонентів).

Існує кілька припущень, що пояснюють синергізм целюлозолітичного комплексу:

1) зняття одним ферментом інгібуючої дії проміжних продуктів гідролізу целюлози (наприклад, целобіози) на інші ферменти целюлазного комплексу;

2) прямий вплив целюлозолітичних ферментів на специфічну активність одне одного (наприклад, внаслідок утворення фермент-ферментного асоціату);

3) реалізація кінетичних закономірностей послідовно (або послідовно-паралельно) діючої ферментної системи. Тобто коли продуктом одного ферменту є субстратом для іншого, без додаткових взаємодій між ферментами [10].

Сучасні дослідження доводять, що ферменти, що здатні до гідролізу целюлози в більшості є мультидоменними білками. Ці протеїни складаються з трьох основних функціональних елементів: каталітичного домену, целюлозозв'язувального домену, а також лінкера, що їх поєднує.

Також до складу целюлозолітичних ферментів можуть входити додаткові структурні одиниці, наприклад, ще один каталітичний домен, фібрoneктин III подібні домени тощо [12].

## **1.2 Характеристика мікроорганізмів, що здатні до деструкції целюлози**

### **1.2.1 Бактерії-деструктори целюлози**

До домену *Bacteria* належить велика кількість мікроорганізмів, що здатні продукувати целюлолітичні ферменти, це можуть бути аеробні, анаеробні, факультативно анаеробні, термофільні бактерії.

Аеробні бактерії здійснюють гідроліз целюлози за допомогою виділення целюлаз в зовнішнє середовище. Також в деяких випадках можливе прикріплення мікроорганізмів до субстрату, але таке прикріплення не є необхідним для деструкції целюлози. Аеробні бактерії та гриби, що здатні гідролізувати целюлозу, є органогетеротрофами та отримують енергію в процесі дихання.

Більшість мікроорганізмів-деструкторів целюлози належать до аеробних організмів, проте орієнтовно 5 – 10 % клітковини розкладають анаероби. На відміну від аеробних бактерій, анаеробні целюлолітики

характеризуються низькою швидкістю росту і поділу клітин, а субстрат перетворюється на продукти бродіння (в тому числі етанол, органічні кислоти, водень та вуглекислий газ). Для деяких анаеробних мікроорганізмів фіксація на субстраті є важливим елементом для подальшого розкладання целюлози. Це можна пояснити тим, що деякі целюлазні системи знаходяться на поверхні клітин або клітинно-глікокалісному матриксі мікроорганізмів [13].

На рисунку 1.4 зображено приналежність мікроорганізмів – деструкторів целюлози до певних груп по відношенню до кисню та температури [13].

Найбільш поширеними в природі анаеробними целюлозолітичними бактеріями є родина *Bacillaceae*, рід *Clostridium*. Їх було виявлено в різних середовищах: лужних, кислих та нейтральних ґрунтах, стічних водах, компості, річковому мулі [14].

Ще однією групою є факультативно-анаеробні целюлолітики, які представлені мезо- та термофільними мікроорганізмами. А саме: *Cellulomonasuda*, *Cellulomonasterrae*, *Telmatobacterbradns*, *Paenibacillus cellulositrophicus*, *Paenibacillus cellulositrophicus* – мезофільні; *Melioribacter roseus* – термофільний представник [13].

Крім того, бактерії *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* та бактерії – антагоністи шкідливої мікрофлори також здатні продукувати целюлолітичні ферменти [15].

Продуктом аеробного гідролізу целюлози є в основному вуглекислий газ та вода, а також в невеликій кількості органічні кислоти. При анаеробному розщепленні целюлози глюкоза, що утворилася на початкових етапах, піддається зброджуванню, в результаті якого утворюються різноманітні органічні кислоти (оцтова, молочна, мурашина, масляна), етанол, вуглекислий газ та водень [17].



За анаеробних умов целюлоза трансформується мезофільними і термофільними бактеріями роду *Clostridium* з утворенням різних кінцевих продуктів (таблиця 1.1)[16].

Таблиця 1.1 – Продукти розкладу целюлози целюлозолітичними клостридіями [16]

Вид	Продукти розкладу
Мезофіли	
<i>C. omelianskii</i>	Етиловий спирт, оцтова, молочна і мурашинакислоти, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
<i>C. dissolvens</i>	Етиловий спирт, оцтова, молочна і масляна кислоти, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
<i>C. cellobioparum</i>	Етиловий спирт, оцтова, мурашина і молочна кислоти, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
Термофіли	
<i>C. thermocellum</i>	Етиловий спирт, оцтова, молочна і мурашина кислоти, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>

Целюлозу розщеплюють також міксобактерії порядку *Myxobacteriales*, родини *Myxococcaceae* (рід *Myxococcus*), *Archangiaceae* (рід *Archangium*), *Sorangiaceae* (роди *Sorangium* і *Polyangium*), які поширені в навколишньому середовищі та здатні існувати в широкому діапазоні умов [14].

У ґрунтах зустрічаються представники роду *Cellulomonas*. Це аеробні грампозитивні рухливі паличкоподібні бактерії неправильної форми; з віком вони іноді перетворюються в коки. Бактерії даного роду беруть участь в розкладанні целюлози в аеробних умовах, однак здатні і до анаеробного розвитку. Зустрічаються ці бактерії в ґрунтах, багатих мінеральними формами азоту [14].

Можуть засвоювати целюлозу поодинокі види *Pseudomonas* (*P. fluorescens* var. *Cellulosae*) і деяких інших бактерій. Актиноміцети, що ростуть у відносно бідних, кислих ґрунтах, в аеробних умовах повільно руйнують целюлозу. До актиноміцетів, що розкладають целюлозу, належать представники родів *Streptomyces* (*Streptomyces cellulosaе*), *Streptosporangium*, *Micromonospora* (*Micromonospora chalcea*) [14].

Наразі домен *Bacteria* преставлений целюлолітиками у філумах: *Ignavibacteriae*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Dictyoglomi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermotogae* (рисунок 1.4).

На рисунку 1.4 видно, що більшість целюлолітичних мікроорганізмів домену *Bacteria* є мезофільними, так як мезофільні умови є оптимальними для гідролізу целюлози. В таких умовах розкладають целюлозу представники порядків *Cytophagales*, *Fibrobacterales*, *Actinomycetales*, *Anaerolineales*, *Bacteroidales*, *Bacillales*, *Clostridiales*, *Flavobacteriales*, *Halanaerobiales*, *Pseudomonadales*, *Acidobacteriales* [13].

Деякі мікроорганізми домену *Bacteria* проявляють целюлолітичні властивості і в термофільних умовах. При цьому вони поділяються на помірно термофільних (діапазон температур 50-65 °С), екстремально термофільних (з оптимумом температур 65-80 °С) і гіпертермофільних (80 °С і вище). Особливу ланку займають термотолерантні бактерії, що можуть рости при температурі 45 °С, але при цьому їх оптимум знаходиться в діапазоні помірних температур [13].

Помірно термофільні целюлолітичні мікроорганізми в основному, відносяться до порядків *Clostridiales* (філуму *Firmicutes*) і *Actinomycetales* (філуму *Actinobacteria*), а також порядків *Flavobacteriales* (філум *Bacteroidetes*), *Thermotogales* (філум *Thermotogae*), *Spirochaetales* (філум *Spirochaetes*), *Ignavibacterales* (філум *Ignavibacteriae*), *Ktedonobacteriales* (філум *Chloroflexi*). Екстремофільні і гіпертермофільні целюлолітичні

бактерії серед домену Bacteria представлені філумами: *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Thermotogae* і *Dictyoglomi* (рисунок 1.4) [13].

Варто відмітити, що бактерії, порівняно з грибами, продукують набагато менше целюлолітичних ферментів, і їх целюлазні системи відрізняються одне від одного. Гриби виділяють три типи целюлаз: ендоглюканази, целобіогідролази та целобіази, що діють в синергізмі, але не взаємодіють одне з одним. Бактерії секретують, в основному, ендоглюканази, більшість з яких має низьку активність по відношенню до кристалічної целюлози. Проте, для багатьох анаеробних бактерій характерне утворення мультимолекулярних комплексів (целюлосом) [5].

### 1.2.2. Гриби-деструктори целюлози

Ґрунт є середовищем для розвитку різноманітних грибів, які представлені всіма класами: фікоміцетами, аскоміцетами, базидіоміцетами, дейтероміцетами. Вони значно відрізняються одне від одного за приналежністю до екологічних груп, типом живлення, взаємодією з іншими організмами. В ґрунті розвиваються сапрофіти, що руйнують рослинні і тваринні рештки, факультативні та облігатні паразити рослин, мікоризоутворювачі, гриби-хижаки.

Гриби є ключовою біотичною ланкою в трансформації органічних речовин, а саме целюлози, лігніну і пектинових речовин. Гриби мають можливість здійснювати процеси амоніфікації, тим самим впливаючи на колообіг азоту. Вони значно впливають своєю життєдіяльністю на інших мікроорганізмів, продукуючи біологічно активні речовини: амінокислоти, ферменти, ліпіди, полісахариди, антибіотики, стимулятори росту рослин, вітаміни, токсичні речовини.

Ґрунтові гриби адсорбують поживні речовини з середовища, тому вони мають велику поверхню контакту з субстратом для кращого

всмоктування. За рахунок швидкого апікального росту, міцеліальної будови, активного метаболізму, продукування антибіотиків і токсинів, гриби швидко колонізують субстрат та позбуваються від конкурентів. зі зменшенням субстрату, відбувається уповільнення метаболізму грибів, тоді утворюються хламідоспори, склероції та інші форми, що знаходяться у стані спокою. Спори можуть легко переноситися з субстрату на субстрат, що обумовлює високу адаптивність грибів до умов навколишнього середовища.

В природних умовах у розкладанні рослин відіграють роль не лише целюлолітичні гриби. Першими проявляють себе факультативні паразити, вони проникають у корені рослин. Після того як рослина гине (наприклад, від тих же паразитичних мікроміцетів), свій вклад вносять сапрофітні гриби, які засвоюють легкодоступні речовини: цукри, крохмаль, геміцелюлозу. Оскільки целюлоза та лігнін є найменш доступними для гідролізу, то целюлозоруйнівні гриби долучаються останніми. Порівняно з сапрофітами, що засвоюють легкодоступні речовини, гриби-деструктори целюлози розвиваються повільніше.

Целюлолітичні мікроміцети представлені більшою мірою аскоміцетами та дейтероіцетами. Найактивнішими целюлолітиками є *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*.

До лігніноруйнівних грибів належать головним чином базидіоіцети. Мікроміцети, що здатні до деструкції лігніну, як і целюлолітики, повільно ростуть та починають розвиватися, коли сапрофіти вже засвоїли всі легкодоступні вуглеводи. Деякі дейтероіцети також можуть розкласти лігнін, це види родів *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Після розкладання рослинних решток починають розвиватися мікроміцети, що здатні розкласти специфічні речовини гумусу і не потребують великої кількості поживних речовин[18].

Основну масу деревини складають лігнін та целюлоза, що поєднані в комплекси. Також в рослинних рештках присутні легкодоступні компоненти деревини (резервні вуглеводи та інші сполуки). Саме з них починається деструкція за участю представників відділу *Ascomycota* та групи анаморфних грибів, які утилізують ці вуглеводи в процесі своєї життєдіяльності. Вони руйнують внутрішній вміст клітин, при цьому не впливаючи на клітинні стінки. Мікроорганізми первинної деструкції – це переважно деревофарбуючі гриби, що отримали свою назву від зміни забарвлення деревини в процесі розкладання: до сіро-синього та коричневого кольору. Роди *Ceratocystis*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium* зумовлюють вивільнення пігментів, головним чином меланінів, що розташовані у клітинних стінках грибів. Оптимальними умовами для їх розвитку є температура від 5 до 30°C і вологість понад 22%. Оскільки вологість є одним з визначальних факторів розвитку грибів, то їх життєдіяльність в деревині триває до повного висихання субстрату [24].

Найважливіший та найбільш тривалий етап деструкції деревини здійснюється лігніно- та целюлозоруйнуючими мікроорганізмами, а саме трутовиками та іншими ксилотрофами. Вони є збудниками брурої та білої гнилі. Гриби брурої гнилі краще розкладають целюлозу, білої гнилі – лігнін. Заключний етап деструкції деревини триває десятки років. В ньому беруть участь як ксилотрофи, так і сапротрофи [24].

Розкладати целюлозу здатні дереворуйнівні базидіоміцети, які синтезують весь комплекс целюлолітичних ферментів, а також представники аскоміцетів та анаморфних грибів. Важливу роль в розщепленні целюлози відіграють мікроміцети із родів *Fusarium* і *Chaetomium*, а також деякі види родів *Stachybotrys*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myrothecium* а саме: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. foetidus*,

*Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum*, *Myrothecium verrucaria*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. harzianum* [24].

Різні мікроорганізми утворюють різноманітні целюлолітичні системи, що відрізняються з сумарною активністю, активністю окремих компонентів, а також оптимальми параметрами середовища.

Найбільш перспективними для використання та продукування в промисловості є целюлолітики *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Physarium*, *Aspergillus*, *Coriolus*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Verticillium* та інші. Здатністю до розчеплення кристалічної целюлози мають далеко не усі гриби, крім того, тільки деякі з них продукують повні позаклітинні целюлолітичні системи (ендо, екзоглюканази та  $\beta$ -глюкозидази). Такі системи продукують *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. koningii*, *Penicillium funiculosum* та *Fusarium solani*. Більшість інших грибів не виділяють фермент екзоглюканазу (що і відповідає за гідроліз кристалічної целюлози), тому можуть розщеплювати лише аморфні форми целюлози [12].

За рахунок комплексу целюлозолітичних ферментів здійснюють мінералізацію органічних решток гриби-деструктори целюлози, одними з найактивніших є роди: *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Cladosporium* [19].

Як вже було зазначено вище, мікроміцети відіграють важливу роль в кругообігу речовин в природі. Вони здійснюють деградацію целюлозовмісних субстратів, рослинних решток, опалого листя, тим самим надаючи можливість для розвитку інших мікроорганізмів, що засвоюють продукти гідролізу. Гідроліз целюлози здійснюється в основному грибами, які за рахунок цього займають ключове місце в процесі колообігу речовин у природі та впливі на родючість ґрунту.

Целюлолітичні мікроорганізми мають не однакову здатність до розщеплення природних целюлозовмісних рослинних субстратів.

Відмінності в такій здатності полягають не тільки в активності і властивостях целюлаз, а і в характері росту, ступені диспергації субстрату, можливості використання продуктів гідролізу целюлози.

Окремо варто відмітити мікроміцет роду *Trichoderma*. Деякі його види є активними продуцентами целюлаз та здатні до глибокої деструкції клітинних стінок рослин в цілому та окремих полісахаридів, що важко розкладаються: целюлози, геміцелюлози, пектину до мономерних форм. Крім того, рід *Trichoderma* має високий антагоністичний потенціал та інгібуючу активність по відношенню до фітопатогенних грибів, таких як *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica* та інших. Гриби цього роду використовують в світовій практиці для створення і розробки біологічних препаратів, виходячи з високого антагоністичного потенціалу, швидкості росту, продукування ферментів целюлолітичного комплексу і можливості культивування в промислових умовах.

Типовим представником цього роду є *Trichoderma viride*, що проявляє властивості і біодеструктора лігніноцелюлозних матеріалів, і високу целюлазну активність на будь-яких поживних середовищах, а також має високий антагоністичний потенціал відносно фітопатогенних організмів [20]. Високу целюлолітичну активність грибів має також вид *Trichoderma harzianum*. Вони так само здійснюють розкладання рослинних решток [15].

Гриби роду *Trichoderma* мають досить характерний вигляд: рясний міцелій, що швидко росте, заповнює всю поверхню середовища в чашці Петрі, зазвичай стелеться павутинчастий, але може бути і пухнастим ватоподібним. Він розвиває рясне зелене (іноді біле) спороношення на міцелії або в характерних подушечках, конідіеносці можуть бути від слабо диференційованих, що утворюються в повітряному міцелії, до складних древоподібно розгалужених, що утворюються в подушечках. Фіаліди, як

правило, флягоподібні в розбіжних мутівках, конідії в слизових голівках [21].

Також одними з найпродуктивніших целюлолітичних мікроміцетів є представники роду *Chaetomium*. Вони володіють високою конкурентоспроможністю відносно інших мікроорганізмів, та не поступаються їм в активності целюлаз [22].

Варто відмітити, що активність ендоглюканаз найбільшою мірою спостерігається в грибів роду *Trichoderma*, а целобіаз – у грибів роду *Aspergillus*. Целюлази *Aspergillus versicolor* відрізняються термостабільністю, ферментні препарати мікроміцету *Trichoderma reesei* – ефективною адсорбцією на поверхні субстрату, а ферментні препарати *Actinomyces diastatias* і *Aspergillus fumigatus* – низькою чутливістю до інгібування продуктами гідролізу целюлози [23].

Целюлолітичні мікроорганізми широко розповсюджені в природі. Вони ростуть при екстремальних умовах середовища, тобто їх можна виявити в різноманітних умовах середовища [25].

### **1.3 Фактори, що впливають на процес деструкції**

Мікроорганізми, що здатні до гідролізу клітковини, відіграють суттєву роль в процесах обміну та мінералізації сполук вуглецю, оскільки в природі синтезується велика її кількість. Крім того, поширення целюлози на планеті вказує на необхідність її розщеплення в різних умовах навколишнього середовища: рН, температури, аерації, вологості [1].

Ці чинники, а також структура середовища (грунту), хімічний склад, вміст органічних речовин, внесення органічних та неорганічних добрив та початковий мікробний склад ґрунту значно впливають на активність целюлолітичних ферментів та власне процесу деструкції целюлози. Таким чином, целюлолітичну активність можна вважати показником при

оцінюванні стану ґрунту за застосування хімічних та органічних добрив [26].

Вологість – один з найбільш важливих параметрів для розвитку деструкторів целюлози. При зменшенні вологості спостерігається послаблення розвитку целюлолітиків, а це в свою чергу викликає зменшення їх дії на субстрат. Це пояснюється тим, що життєдіяльність як бактерій, так і грибів в цілому неможлива умовах недостатнього зволоження. Вода у середовищі розвитку мікроорганізмів відіграє основну роль при надходженні поживних речовин та виділенні продуктів обміну. Для бактерій мінімальна вологість середовища складає від 20 до 30 % загальної маси організму, гриби мають здатність розвиватися при значно меншій вологості субстрату (від 10 до 15 %). Проте, навіть за посушливих умов, біодеструктори мають високий рівень ефективності [27, 28].

Важливим фактором для гідролізу целюлози мікроорганізмами є сама целюлоза. Впливають ступінь кристалічності, величина питомої поверхні, ступінь поляризації. При зменшенні ступеня кристалічності відбувається збільшення ефективності гідролізу, так само як і при збільшенні питомої поверхні. Проте подрібнення субстрату не є вирішальним фактором для збільшення ефективності гідролізу целюлози [16].

Як вже було показано в попередніх підрозділах, мікроорганізми-деструктори присутні і в аеробній, і в анаеробній групі. Більшість таксономічних груп розщеплюють целюлозу а аеробних умовах. В даному випадку важливим фактором є тип ґрунтів, в яких розвиваються мікроорганізми. У кислих лісових ґрунтах провідну роль у розкладанні целюлози мають мікроміцети родів *Trichoderma*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*. У степових і лугових ґрунтах розкладання целюлози в першу чергу здійснюють міксобактерії родів *Archangium* і *Polyangium*, цитофаги родів *Cytophaga* і *Sporocytophaga*, а також бактерії, що входять до складу

родів *Vibrio*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* і *Bacillus*. Крім різних бактерій і грибів, у процесі аеробного розкладання целюлози беруть участь актиноміцети, з яких найбільш активні представники родів *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*.

Процес перетворення целюлози в аеробних та анаеробних умовах представлено на рисунку 1.5.

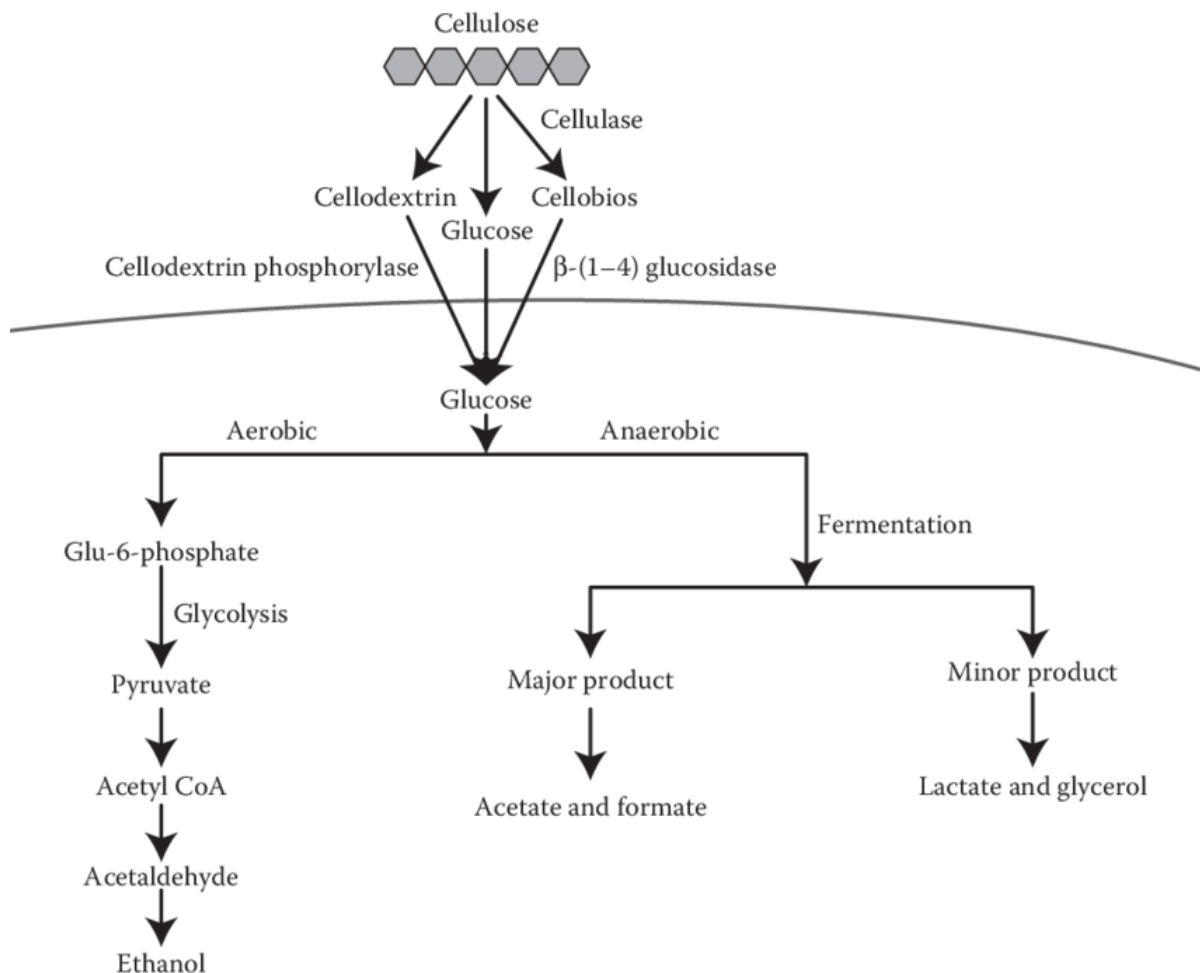


Рисунок 1.5 - Перетворення целюлози в аеробних та анаеробних умовах [34]

В анаеробних умовах целюлозу розкладає значно менше мікроорганізмів, оскільки на це здатні лише бактерії. Рід *Clostridium* заслуговує особливої уваги, оскільки більшість анаеробів-целюлолітиків належать саме до нього. У 1902 році В.Л. Омелянський виділив типовий представник анаеробних целюлозоруйнівних бактерій є *Cl. omelianskii* [1].

Наступний параметр, що значно впливає на процес деструкції, - температура. Всі мікроорганізми поділяються на три групи відносно температури середовища: психрофіли, мезофіли, термофіли.

Мезофіли – мікроорганізми, мінімальні температури для яких перебувають у межах від 0 до 10 °С, оптимальні – близько 25–35 °С, максимальні – 40–50 °С. Більшість целюлолітиків належать саме до цієї групи, оскільки даний діапазон температур є оптимальним для целюлаз. *Cl. omelianskii* – мезофіл, оптимальна температура росту становить 30–40 градусів.

Термофіли – група мікроорганізмів, що не лише мають здатність розвиватися при високих температурах, а в деяких випадках і мають оптимум. Серед анаеробних целюлозоруйнуючих бактерій види, що щонайкраще розвиваються при температурі 60–65 градусів. До термофілів відноситься *Cl. thermocellum* [1].

Психрофіли – мікроорганізми, мінімальні температури для них -10 – 0 °С, оптимальні – від 10 до 15 °С і максимальні – близько 30 °С. Психрофіли живуть у ґрунтах полярних країн, холодних морях і океанах, льодах, на заморожених продуктах тощо. Низькі температури мікроби витримують порівняно легко. Наприклад, деякі види бактерій не втрачають життєздатності навіть при температурі рідкого водню (-253 °С). При дії низьких температур прокаріоти можуть впадати в анабіотичний стан, зберігаючи тривалий час свою життєдіяльність. Проте, серед целюлолітичних мікроорганізмів психрофілів не знайдено [1].

Значний вплив на життєдіяльність мікроорганізмів чинить рН. Оскільки для целюлаз оптимальним є кисле або нейтральне середовище, то, відповідно, мікроорганізмів, що добре розвиваються в лужному середовищі (алкалофільних) серед целюлолітиків не виявлено [28, 1].

Для дослідження було обрано целюлолітичних представників целюлолітичних бактерій та грибів з метою порівняння їх целюлазної

активності з використанням різних типів субстрату та методів визначення ферментативної активності. Вибір продуцентів здійснювався відповідно до наведеної в даному розділі інформації про мікроорганізми-деструктори целюлози з врахуванням їх наявності в початковій колекції мікроорганізмів ТОВ «ІНСТИТУТ АГРОБІОЛОГІЇ».

Було обрано такі бактеріальні культури: *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, усі вони вимагають приблизно однакових умов культивування, є аеробами (або факультативними анаеробами - *Paenibacillus polymyxa*), мезофілами, що дає можливість перевіряти їх целюлолітичну активність одночасно і в однакових умовах.

Серед грибів було обрано продуценти *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, які в той самий час у різних джерелах були названі «найкращими» або «одними з найефективніших» деструкторами целюлозо- та лігніновмісної сировини.

## **РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУВАЛИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЦЕЛЮЛАЗ МІКРООРГАНІЗМІВ-ДЕСТРУКТОРІВ ЦЕЛЮЛОЗИ**

### **2.1 Визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом**

Існує ряд методів визначення ендоглюканазної активності - колориметричний метод, віскозиметричний метод, метод Шомоді-Нельсона і багато інших. Однак всі ці методи є доволі складними, їх неможливо використовувати для одночасного тестування десятків зразків при виконанні селекційних робіт. Крім того, методи засновані на визначенні хімічних компонентів зразків незручні тим що дають не зовсім ту інформацію, яка потрібна для практичного застосування – деструкція целюлози здійснюється різними ферментами, знати кількість кожного з них не потрібно, але обов'язково потрібно знайти їх сумарну целюлолітичну активність (що власне і є практично найбільш важливою характеристикою штаму). Саме тому було обрано так званий лунковий метод визначення активності целюлолітичних ферментів.

Принцип лункового методу полягає у взаємодії барвника конго-червоного з полісахаридом, що містить зв'язки  $\beta$  (1.4) або  $\beta$  (1.3). Така взаємодія стає причиною утворення комплексу насиченого червоного кольору, в свою чергу, фермент  $\beta$ -глюконаза запобігає утворенню такого комплексу, завдяки чому ми можемо спостерігати так звані «зони просвітлення» [29].

В таблиці 3.1 представлені реактиви, поживні середовища, культури мікроорганізмів та обладнання, що необхідні для проведення дослідів.

Таблиця 2.1 – Матеріали, реактиви та обладнання

Реактиви та ПС	Культури мікроорганізмів	Обладнання
Манітно-дріжджове середовище	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Термостат Мікробіологічна качалка Центрифуга Автоклав Сушильна шафа Газовий пальник
Кукурудзяно-мелясне середовище	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	
МПА солодовий агар Карбоксиметилцелюлоза Конго червоний 0,1 %-й розчин		

### Методика виконання експерименту

#### 1. Підготовка рідкого поживного середовища

1.1. Змішування компонентів середовища та додавання до основного складу поживного середовища (ПС) карбоксиметилцелюлози (КМЦ) в розрахунку 2 г/дм<sup>3</sup>. Для мікроміцетів використовується кукурудзяно-мелясне середовище, а для бактерій – манітно-дріжджове (склад поживних середовищ наведено в додатку А).

1.2. Стерилізація ПС. Стерилізація забезпечується завдяки таким режимам автоклавування:

Манітно-дріжджове середовище – 0,75 атм 30 хв

Кукурудзяно-мелясне середовище – 1 атм 60 хв

1.3. Охолодження ПС.

#### 2. Підготовка посівного матеріалу

2.1. Пересівання культур мікроорганізмів з пробірок зі старою культурою на скошеному агарі на нові.

2.2. Вирощування культур в термостаті.

#### 3. Підготовка дослідної культури мікроорганізмів

3.1. Пересівання культур мікроорганізмів з нових пробірок зі скошеним агаром у колби на 1 дм<sup>3</sup> з рідким поживним середовищем (600 або 300 см<sup>3</sup> рідини для бактерій та грибів відповідно).

3.2. Культивування протягом 4 діб при T=28 °C.

#### **4. Підготовка твердого поживного середовища**

4.1. Змішування компонентів середовища та додавання до основного складу ПС карбоксиметилцелюлози (КМЦ) в розрахунку 2 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>. Для мікроміцетів використовуюється солодовий агар, а для бактерій – м'ясо-пептонний агар.

4.2. Стерилізація ПС. Стерилізація забезпечується завдяки таким режимам автоклавування:

Солодовий агар – 1 атм 60 хв

М'ясо-пептонний агар – 0,75 атм 30 хв

4.3. Охолодження ПС.

#### **5. Центрифугування культуральної рідини мікроорганізмів.**

5.1. З колб відбирається по 10 см<sup>3</sup> культуральної рідини кожної культури.

5.2. Центрифугуванням відділяється рідка фаза культуральної рідини від мікроорганізмів, що осідають на дно пробірки. Частота обертання – 2000 об/хв.

5.3. Фугат зливають в іншу пробірку та використовують в подальшому дослідженні.

#### **6. Визначення здатності мікроорганізмів до продукування целюлолітичних ферментів лунковим методом**

6.1. В агаризованому середовищі у чашках Петрі за допомогою «пробійника» утворюють лунки однакового діаметру, по 3 шт у кожній чашці.

6.2. В кожну лунку заливають по 1 краплі фугату мікроорганізмів.

6.3. Інкубація відбувалася протягом 24 годин при температурі 37 °C.

6.4. Після інкубації середовище фарбують барвником конго-червоний, витримують 15 хв та змивають 1 М розчином NaCl.

6.5. Після цього вимірюють діаметр лунок.

## **2.2 Метод обрахунку діаметра зони просвітлення за допомогою програми ImageJ**

Обрахунок діаметра утворених зон просвітлення здійснювався за допомогою програми ImageJ.

Для визначення діаметра необхідно скористатися функцією «Straight» та відміряти на скані довжину об'єкта, а далі натиснути «М» для подальшого збереження даних в таблицю.

Щоб виміряти діаметр у потрібній нам розмірності: вибрати пункт Analyze - Set Scale. Далі відкритому вікні встановити значення «Knowndistance:1.00», а значенню «Distanceinpixels:» присвоїти кількість пікселів, що відповідають потрібній одиниці вимірювання, поставити галочку «Global», вказати назву розмірності у пункті «Unitoflength» та натиснути «ОК».

Для переведення пікселів в міліметри було вирішено застосовувати лінійку на фотографії. Для цього необхідно за допомогою функції «Straight» позначити на фотографії 1 см на лінійці (10 мм), а потім за допомогою пункту Analyze - Set Scale виставляється відповідність 10 мм тій кількості довжині 1 см в пікселях.

## **2.3 Ваговий метод визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов**

Суть методу полягає в тому, що целюлозовмісний матеріал (бавовняну тканину) поміщають в шар ґрунту, який обробляють

культуральною рідиною різних мікроорганізмів або сумішшю мікроорганізмів. Після цього спостерігають за біодеградацією целюлозовмісного матеріалу протягом певного періоду.

Метод дозволяє визначити загальну целюлолітичну активність мікроорганізмів в умовах наближених до природних. Тому має особливу цінність для дослідження мікроорганізмів для розробки целюлолітичних препаратів для деградації рослинних відходів.

Таблиця 2.2 – Матеріали, обладнання та реактиви

Реактиви та ПС	Культури мікроорганізмів	Обладнання
Кукурудзяно-мелясне середовище	Монокультури: <i>1. Trichoderma viride</i>	Термостат
Целюлозовмісна сировина (бавовняна тканина)	<i>2. Chaetomium globosum</i>	Мікробіологічна качалка
Ґрунт	Суміш 1. <i>Pseudomonas aureofaciens,</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Автоклав
Вода питна	Суміш 2. <i>Trichoderma viride,</i>	Сушильна шафа
Середовище Чапека	<i>Chaetomium globosum,</i>	Газовий пальник
МПА	<i>Pseudomonas aureofaciens,</i>	
Манітно-дріжджове середовище	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	

### Методика виконання експерименту

#### 1. Підготовка ґрунту:

- 1.1. Просіювання та переміщення ґрунту у скляні ємності на 0,5 л;
- 1.2 Стерилізація закритих ємностей з ґрунтом в сушильній шафі при  $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 8 годин 2 рази.

#### 2. Підготовка целюлозовмісного субстрату (бавовняної тканини):

2.13 тканини вирізають коло, діаметр якого дорівнює діаметру ємності;

- Висушування тканини у сушильній шафі при  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  до постійної маси;
- Зважування тканини після висушування;
- Повторна стерилізація тканини.

### 3. *Підготовка системи тканина/грунт до інокуляції:*

- У стерильну ємність зі стерильним ґрунтом вкладається тканина після стерилізації;
- На тканину зверху насипається шар простерилізованого ґрунту товщиною 1 см;
- Ємність закривається та стерилізується ще раз.

### 4. *Підготовка посівного матеріалу:*

- Пересівання культур мікроорганізмів з пробірок зі старою культурою на скошеному агарі на нові;
- Вирощування культур в термостаті;
- Пересівання культур мікроорганізмів з нових пробірок зі скошеним агаром у колби на 1 дм<sup>3</sup> (600 або 400 см<sup>3</sup> рідини);
- Культивування протягом 4 діб при T=28 °C.

### 5. *Інокуляція ємностей із ґрунтом:*

- Внесення 30 см<sup>3</sup> стерильної води у кожен ємність;
- Пересів в асептичних умовах мікроорганізмів із колб в стерильні ємності з ґрунтом. В кожен ємність по 3 см<sup>3</sup> культуральної рідини відповідних мікроорганізмів.
- Вноситься ще 17 см<sup>3</sup> стерильної води (у контроль – 20 см<sup>3</sup>).

### 6. *Контроль вологості середовища* (ємності з ґрунтом) та періодичний полив в стерильних умовах.

### 7. Запис спостережень

Проводиться зважування тканини, що знаходилася під дією того чи іншого мікроорганізму, а також контролю. Для цього, полотно виймається із землі, очищується від залишків мікроорганізмів, ґрунту, висушується та зважується.

На основі зменшення маси целюлозовмісного субстрату в процесі культивування роблять висновок про загальну целюлолітичну активність досліджуваних мікроорганізмів.

## 2.4 Спектрофотометричний метод визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів

КМЦ-активність – це перш за все активність ендо-1,4-β-глюканаз мікроорганізмів. Суть методу полягає у визначенні швидкості гідролізу карбоксиметилцелюлози, яка дорівнює 1 мкмолью редуруючих цукрів (PP-редуючих речовин), що утворюються за 1 хвилину при 40 °С[30].

Глюкоза окиснюється фериціанідом в лужному середовищі до глюконової кислоти (рисунок 2.1). Червона кров'яна сіль відновлюється при цьому до жовтої кров'яної солі. Оскільки реакція оборотна, то жовту кров'яну сіль, що утворилася руйнують нагріванням.

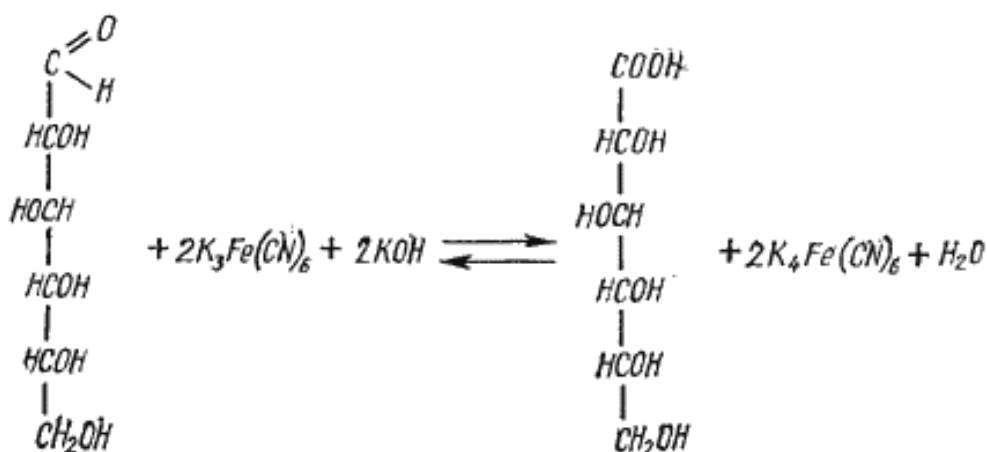


Рисунок 2.1 – Реакція окиснення глюкози фериціанідом [35]

Метод базується на колориметричному визначенні оптичної густини розчину розчину фериціаніду, надлишок якого залишився після реакції з редуруючими речовинами [31].

Для колориметрії використовували спектрофотометр двопроменевий PGInstruments T60.

Матеріали, реактиви та обладнання, що необхідні для проведення дослідження наведені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3–Матеріали, реактиви та обладнання

Реактиви та ПС	Культури мікроорганізмів	Обладнання
Кукурудзяно-мелясне середовище КМЦ Гідроксид натрію Фериціанід Глюкоза	Монокультури: 1. <i>Trichoderma harzianum</i> 2. <i>Trichoderma viride</i> 3. <i>Chaetomium globosum</i> 4. <i>Bacillus subtilis</i> 5. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Термостат Мікробіологічна качалка Центрифуга Автоклав Сушильна шафа
	Суміш 1. <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Газовий пальник Спектрофотометр Витяжна шафа Водяна баня
	Суміш 2. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	

### Методика виконання експерименту

#### 1. Підготовка рідкого поживного середовища

- 1.1. Приготування кукурудзяно-мелясного середовища.
- 1.2. Стерилізація ПС. Стерилізація здійснюється при такому режимі автоклавування для кукурудзяно-мелясного середовища – 1 атм 60 хв.
- 1.3. Охолодження ПС.

#### 2. Підготовка посівного матеріалу

- 2.1. Пересівання культур мікроорганізмів з пробірок зі старою культурою на скошеному агарі на нові.
- 2.2. Вирощування культур в термостаті.

#### 3. Підготовка дослідних культур мікроорганізмів

- 3.1 Пересівання культур мікроорганізмів з нових пробірок зі скошеним агаром у колби з рідким поживним середовищем на 1 дм<sup>3</sup> (по 600 см<sup>3</sup> рідини у кожній).
- 3.2. Культивування протягом 8 діб при T=28 °C.

#### 4. Центрифугування культуральної рідини мікроорганізмів.

4.1. З колб відбирається по  $10 \text{ см}^3$  культуральної рідини кожної культури або суміші культур.

4.2. Центрифугуванням відділяється рідка фаза культуральної рідини від мікроорганізмів, що осідають на дно пробірки. Частота обертання – 3500 об/хв протягом 15 хв.

4.3. Фугат зливають в іншу пробірку та використовують в подальшому дослідженні.

## **5. Приготування реактивів та побудова калібрувального графіка для визначення вмісту РР у фугаті**

5.1. Приготування розчину фериціаніду: 8 г фериціаніду (червоної кров'яної солі) та 20 г гідроокису натрію окремо розчиняють в невеликій кількості дистильованої води, потім обидва розчини зливають в мірну колбу місткістю  $1000 \text{ см}^3$  та доводять до мітки дистильованою водою.

5.2. Приготування стандартного розчину глюкози: 1,6 г безводної глюкози зважують з точністю до 0,0002 г та розчиняють в мірній колбі місткістю  $1000 \text{ см}^3$ .

5.3. Побудова калібрувального графіка:

Для побудови калібрувального графіка потрібно приготувати серію розведень стандартного розчину глюкози.

В пробірки внести по  $3 \text{ см}^3$  розчину фериціаніду та по  $1 \text{ см}^3$  розчину глюкози відповідного розведення. Пробірки помістити на киплячу водяну баню на 15 хв, при цьому спостерігати, щоб розчини не знебарвились. Якщо розчин знебарвлюється, то потрібно зменшити кількість глюкози в розчині. Охолодити під проточною водою пробірки.

Після охолодження відібрати по  $1 \text{ см}^3$  розчинів в колбу та довести їх об'єми до  $10 \text{ см}^3$  дистильованою водою виміряти оптичну густину отриманих розчинів на спектрофотометрі при 400 нм в кюветі 10 мм, контроль – перший розчин.

Побудувати графік залежності оптичної густини від концентрації глюкози.

## **6. Визначення вмісту редукуючих речовин у фугаті культуральної рідини.**

В пробірку вносять 3 см<sup>3</sup> розчину фериціаніду та 1 см<sup>3</sup> культурального фільтрату, пробірки поміщають на киплячу водяну баню на 15 хв, слідкують, щоб розчин не знебарвився. Після цього розчин охолоджують та вимірюють оптичну густину. За калібрувальним графіком або за допомогою рівняння визначають вміст РР.

## **7. Визначення КМЦ-активності**

7.1 В пробірку додають 4 см<sup>3</sup> 0,3 % розчину КМЦ та 1 см<sup>3</sup> досліджуваного фугату, в контрольну пробірку замість фугату додають дистильовану воду. Інкують всі пробірки протягом 30 хв при 40 °С.

7.2 Визначають в дослідних та контрольній пробірках вміст редукуючих речовин, що утворилися при гідролізі КМЦ. Для цього в пробірку вносять 3 см<sup>3</sup> розчину фериціаніду та 1 см<sup>3</sup> досліджуваного розчину (дослідних з фугатом та контрольного), пробірки поміщають на киплячу водяну баню на 15 хв, слідкують, щоб розчин не знебарвився. Після цього розчин охолоджують. Відбирають 1 см<sup>3</sup> розчину та доводять об'єм до 10 см<sup>3</sup> дистильованою водою. Вимірюють оптичну густину цього розчину при 400 нм в кюветі 10 мм. За калібрувальним графіком або за допомогою рівняння визначають вміст РР.

7.3 Розраховують активність за формулою

$$A = \frac{(5 \times B - C - 5 \times D) \times 0,28}{30}$$

де А – активність ферменту, мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв); В – кількість РР у реакційній суміші після проведення 30-хвилинної інкубації, мг; С – кількість РР у досліджуваному фільтраті мг; Д – кількість РР у контрольній пробірці, мг; 0,28 – коефіцієнт для перерахунку з мг в мкмолі; 30 –

коефіцієнт для перерахунку активності у хвилини; 5 – коефіцієнт для перерахунку на загальний об'єм реакційної суміші.

## 2.5 Візуальний метод визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату

Метод полягає в спостереженні за ростом культури мікроорганізмів на чашках Петрі з відповідними середовищами та додаванні до них паперового субстрату.

Таблиця 2.4 Матеріали, реактиви та обладнання

Реактиви та ПС	Культури мікроорганізмів	Обладнання
Середовище Чапека	<p><i>Монокультури:</i></p> <p>1. <i>Trichoderma harzianum</i></p> <p>2. <i>Trichoderma viride</i></p> <p>3. <i>Chaetomium globosum</i></p> <p>Суміші культур мікроорганізмів</p> <p>Суміш 1: <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i></p> <p>Суміш 2 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Chaetomium globosum</i></p>	<p>Термостат</p> <p>Автоклав</p> <p>Газовий пальник</p> <p>Сушильна шафа</p>
МПА	<p>Суміш 3 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i></p> <p>Суміш 4 <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i></p> <p>Суміш 5 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i></p>	

Протягом експерименту здійснюється фотофіксація.

## **Методика виконання експерименту**

### ***1. Підготовка стерильного поживного середовища***

1.1 Приготування та стерилізація ПС. Для дослідження здатності мікроорганізмів до деструкції целюлози за використання паперового матеріалу як субстрату готують агаризоване поживне середовище на основі середовища Чапека та МПА (склад середовища наведено в додатку А).

Стерилізація здійснюється при режимі автоклавування 0,75 атм протягом 30 хв.

1.2 Розливання ПС по чашках Петрі, охолодження до зникнення конденсату.

1.3 Підготовка стерильної води (автоклавування при 0,75 атм протягом 30 хв).

### ***2. Підготовка посівного матеріалу***

2.1. Пересівання культур мікроорганізмів з пробірок зі старою культурою на скошеному агарі на нові.

2.2. Вирощування культур в термостаті.

### ***3. Посів мікроорганізмів та їх сумішей на чашки Петрі.***

3.1 Змішування культур мікроорганізмів у стерильній воді.

3.2 Висівання методом штриха на чашки Петрі. Культури *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* та їх суміші (*Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viride*; *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viride* + *Chaetomium globosum*) висівалися на середовище Чапека, а комбінації з бактеріями – на МПА.

3.3 Вкладання паперового матеріалу поверх штриха.

### ***4. Фотофіксація на різних етапах росту культур.***

## 2.6 Мікроскопічний метод визначення морфологічних ознак досліджуваних мікроорганізмів

Визначення морфо-фізіологічних ознак мікроорганізмів в процесі культивування за допомогою світлової мікроскопії дає змогу швидко і якісно оцінити цілий ряд параметрів, що характеризують ріст та розвиток досліджуваних мікроорганізмів в умовах експерименту. Для оцінки сприятливості умов культивування та складу штучно-створеного угруповання для росту і розвитку окремих видів мікроорганізмів препарати приготовані на основі мікроорганізмів вирощених в дослідних умовах порівнюють з препаратами приготованими на основі культур, які вирощені в оптимальних умовах для конкретного виду.

Для того, щоб максимально добре розвинути структури мікроорганізмів, при мікроскопіюванні необхідно використовувати молоді культури, тому першим підготовчим етапом є пересівання культур мікроорганізмів зі старого середовища на нове.

*Chaetomium globosum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* культивувалися 72 години на середовищі Чапека.

*Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paeniacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* культивувалися протягом 24 годин на середовищі МПА.

Мікроскопію досліджуваних мікроорганізмів проводили наступним чином: мікроміцетів досліджували за допомогою препарату «роздавлена крапля», а бактеріальні культури фіксували на предметному скельці та фарбували за Грамом.

Мікроскопічний аналіз проводили на світловому мікроскопі Optika B-383PLi FMA050 при збільшенні окуляра  $10^{\times}$ , об'єктивів  $40^{\times}$  для грибів,  $100^{\times}$  для бактерій.

## РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Результати визначення целюлозолітичної активності мікроорганізмів лунковим методом

Під час зняття експериментальних даних було зроблено фотографії зон просвітлення на чашках Петрі, потім ці зони було виміряно за допомогою програми ImageJ. Результати дослідження представлені на рисунку 3.1.

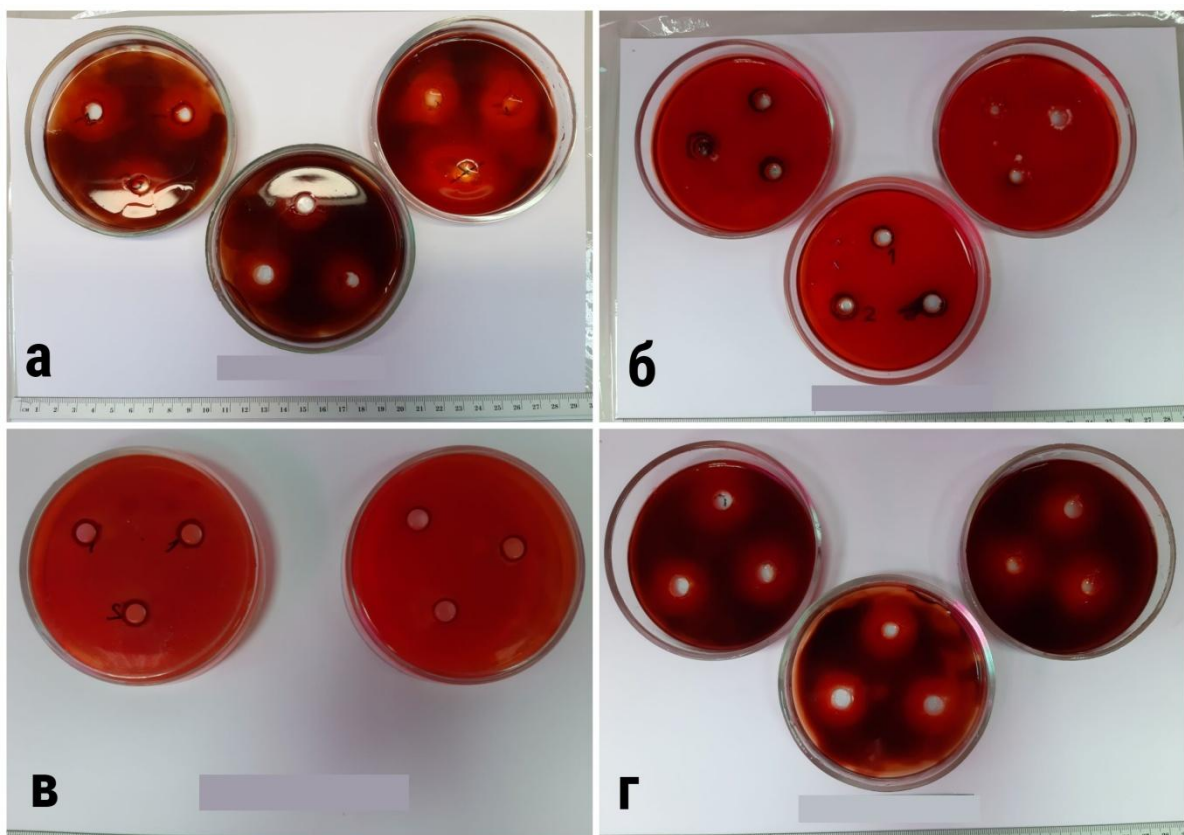


Рисунок 3.1 –Фотографії дослідних чашок Петрі після 24 годин інкубації.

На фото видно зони просвітлення в результаті целюлолітичної дії ферментів, що містяться в культуральному фігаті мікроорганізмів: а) *Trichoderma harzianum*; б) *Paenibacillus polymyxa*; в) *Bacillus subtilis*; г) *Chaetomium globosum*.

На жаль, середовище МПА світлого кольору, тому зони просвітлення на ньому помітні лише при направленні на яскраве освітлення.

Дані, зібрані в ході експерименту були згруповані у таблицю 3.1

Таблиця 3.1 – Діаметри зон просвітлення навколо дослідних лунок для досліджуваних мікроорганізмів

Повторність	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
1	27	20	29	-
2	28	20	28	-
3	27	20	27	-
4	26	21	29	-
5	27	-	28	-
6	27	-	28	-
7	27	-	28	-
Ср.знач	27,00	20,25	28,14	-
Відхилення	0,577350269	0,5	0,690065559	0

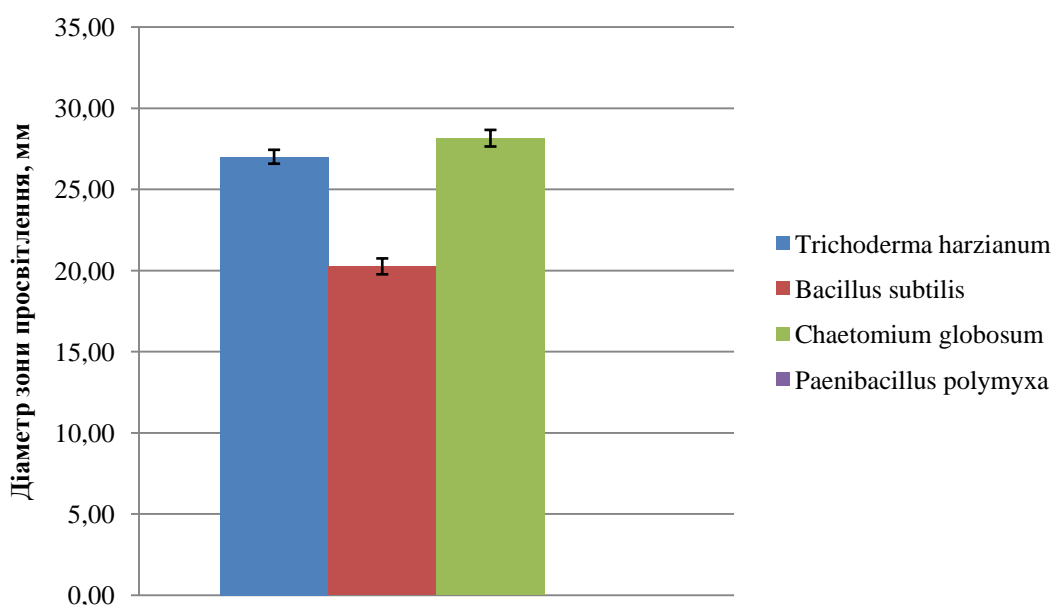


Рисунок 3.2 – Середній діаметр зони просвітлення для досліджуваних мікроорганізмів при дослідженні целюлозолітичної активності лунковим методом (активність *Paenibacillus polymyxa* не було виявлено)

З представлених даних можна зробити висновок про те, що мікроміцет *Chaetomium globosum* має найбільшу целюлолітичну активність з обраних мікроорганізмів. Наступним є мікроміцет *Trichoderma harzianum*. Серед досліджуваних мікроорганізмів бактерії характеризуються нижчою целюлолітичною активністю. *Bacillus subtilis* володіє целюлолітичною активністю, проте значно нижчою ніж мікроміцети, в той час як *Paenibacillus polymyxa* взагалі не проявив себе як продуцент целюлолітичних ферментів.

### **3.2 Результати визначення целюлолітичної активності шляхом імітації польових умов**

Целюлолітичні ензими, які відіграють основну роль в розкладанні целюлозовмісних відходів, продукуються великою кількістю бактерій та грибів. Проте, здатність до синтезу високих рівнів позаклітинних целюлаз характерна лише для обмеженого кола мікроорганізмів.

Визначення целюлолітичної активності шляхом імітації польових умов проводили відповідно до методики описаної у п. 2.3. Як целюлозовмісний субстрат використовували тканину (100% бавовна).

Перед інокуляцією ємностей з ґрунтом і тканиною визначили титр інокуляту. Титр інокуляту –  $1 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. На рисунку 3.3 наведено фото колб з посівним матеріалом. Склад інокулятів наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 - Склад інокулятив

Гриби	Бактерії
Гриб 1 <i>Trichoderma viride</i>	Суміш бактерій <i>Pseudomonasaureofaciens</i> , <i>Pseudomonasfluorescens</i>
Гриб 2 <i>Chaetomiumglobusum</i>	
Суміш м/о	
<i>Trichoderma viride</i> , <i>Chaetomiumglobusum</i> , <i>Pseudomonas aureofaciens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Контроль – без внесення мікроорганізмів	



Рисунок 3.3 – Фото колб з культурами мікроорганізмів, що були використані в експерименті та контроль (стерильна вода)

Культивування досліджуваних мікроорганізмів та сумішей мікроорганізмів в ємностях з системою ґрунт/тканина (рисунок 3.4) проводили при температурі 18 °С. Загальна тривалість дослідження 83 доби.



Рисунок 3.4 – Фото ємностей з системою ґрунт/тканина на етапах «закладання» досліду з визначення целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов

Здатність досліджуваних мікроорганізмів до біодеградації целюлозовмісного субстрату оцінювали на основі даних про зменшення маси субстрату протягом культивування.

Масу субстратів в кожній ємності визначали через 47, 52, 60 та 83 доби. На рисунках 3.5 та 3.6 представлені фотографії на 52 та 60 добу експерименту.

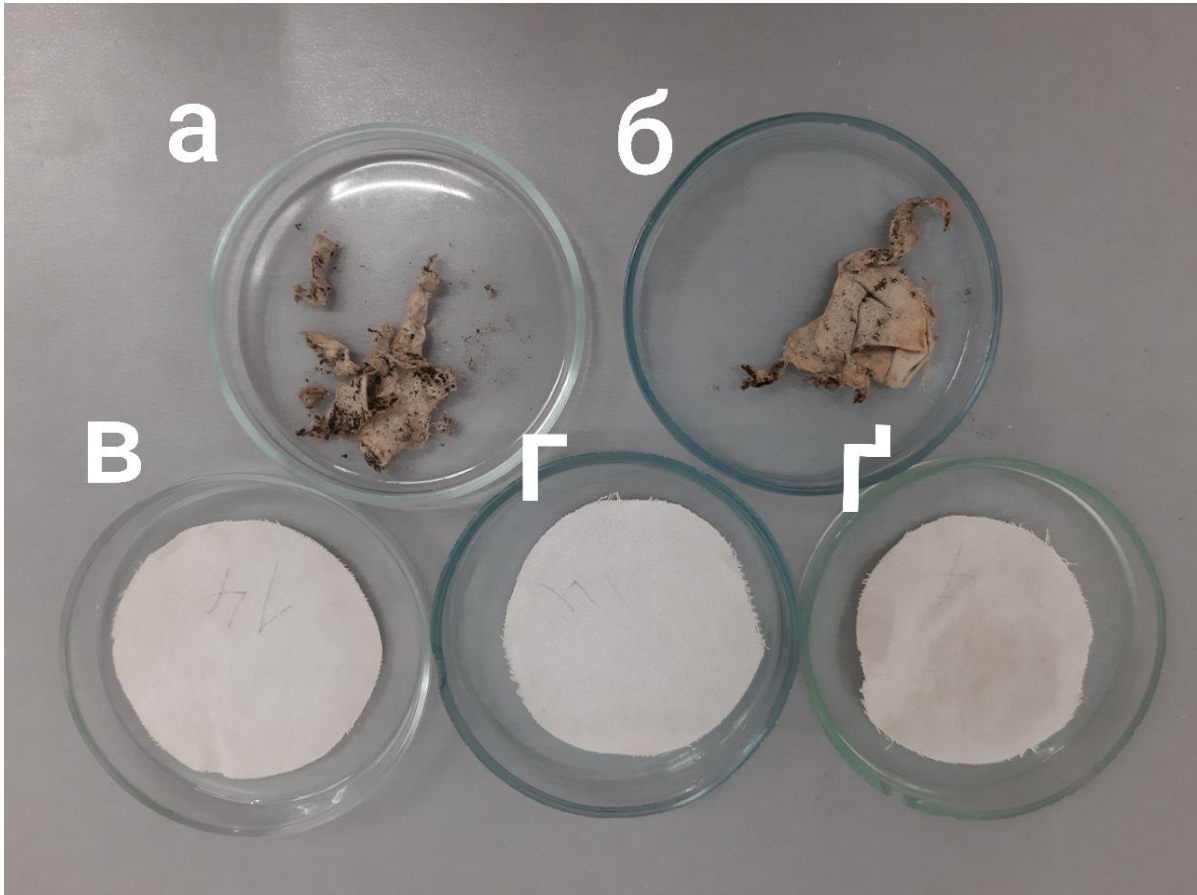


Рисунок 3.5 – Фото целюлозовмісного субстрату з ознаками біодеградації на 52 добу експерименту під дією: а) *C. globosum*; б) суміші мікроорганізмів; в) суміші бактерій; г) контроль; ґ) *Trichoderma viride*

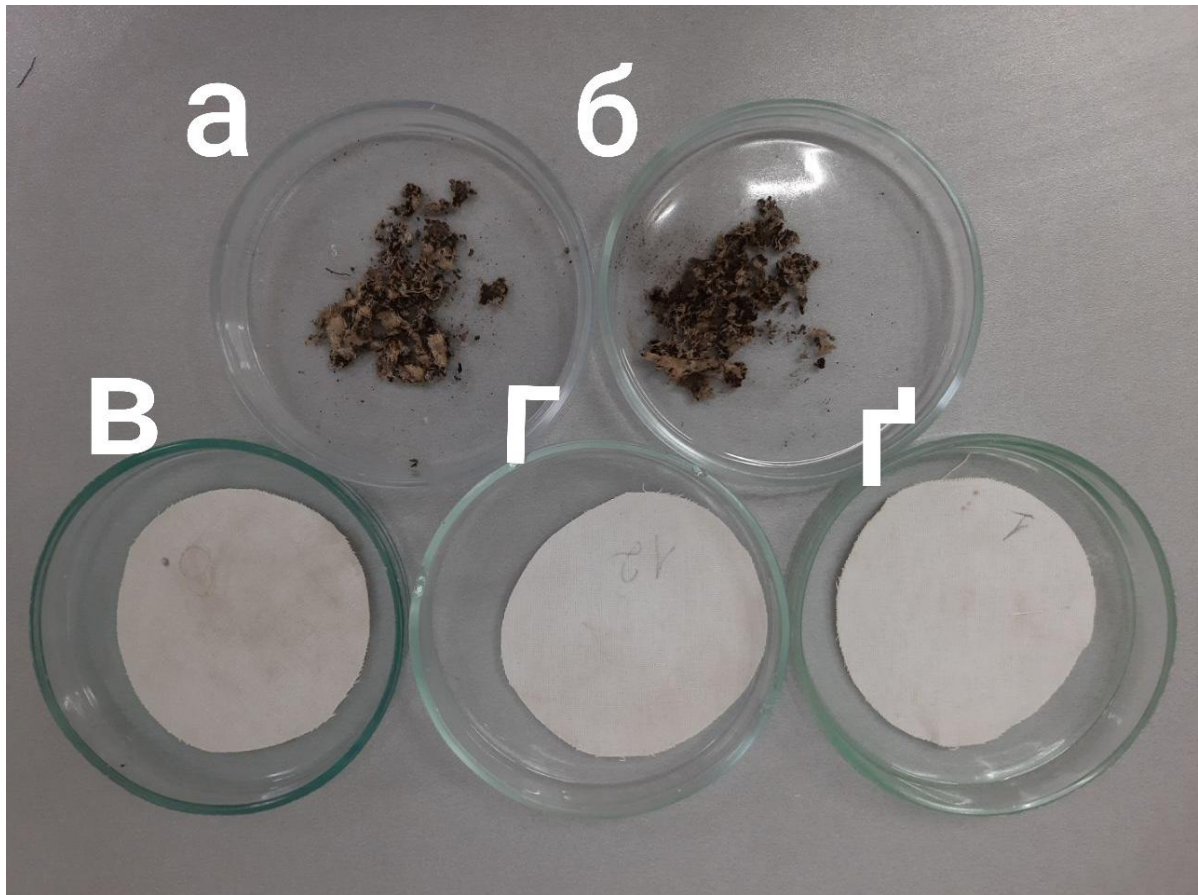


Рисунок 3.6 – Фото целюлозовмісного субстрату з ознаками біодеградації 60 добу експерименту під дією: а) *C. globosum*; б) суміші мікроорганізмів; в) *Trichoderma viride*; г) суміші бактерій; г) контроль

На фото видно, що на 60 добу тканина більш пошкоджена. Під час відмивання вона розсотувалась, її було важко відділити від ґрунту та зібрати на ситі. Це можна пояснити тим, що з часом тканина розкладається ще більше, а волокна при цьому відділяються одне від одного. На 83 добу культивування більшість волокон перетворилися на труху за дії *Tr. viride*, *C. globosum* та суміші всіх мікроорганізмів.

Результати дослідження целюлозолітичної активності шляхом імітації польових умов наведені на рисунках 3.7 – 3.9.

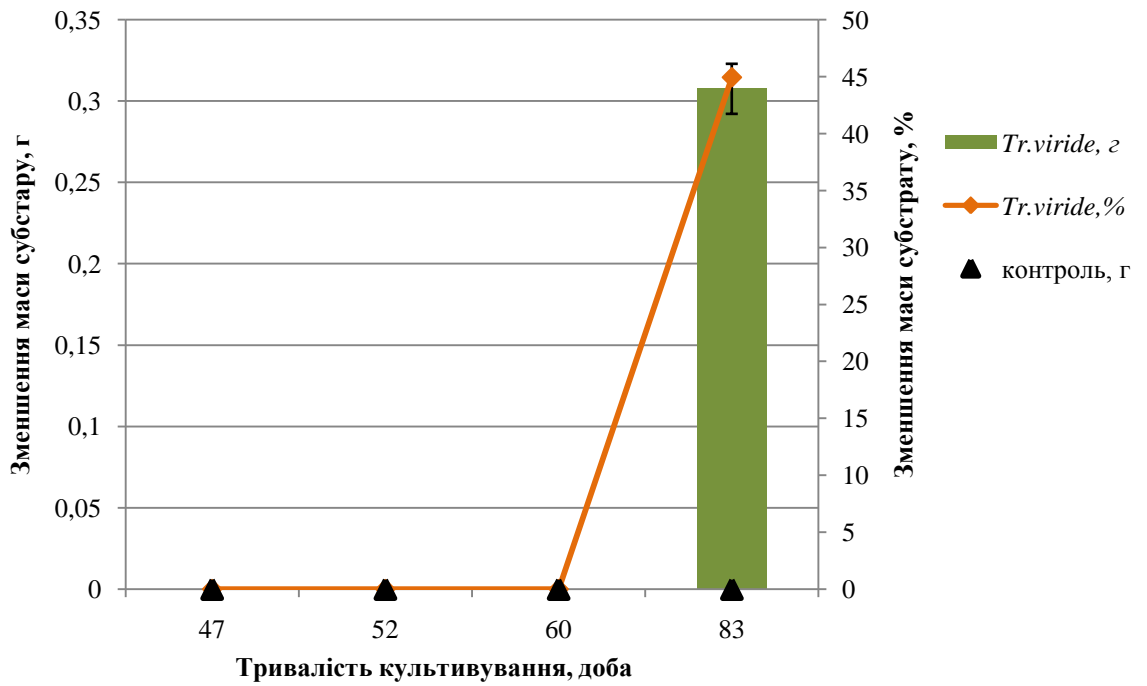


Рисунок 3.7 – Зменшення маси субстрату в г та у % при різній тривалості культивування *Tr. viride*

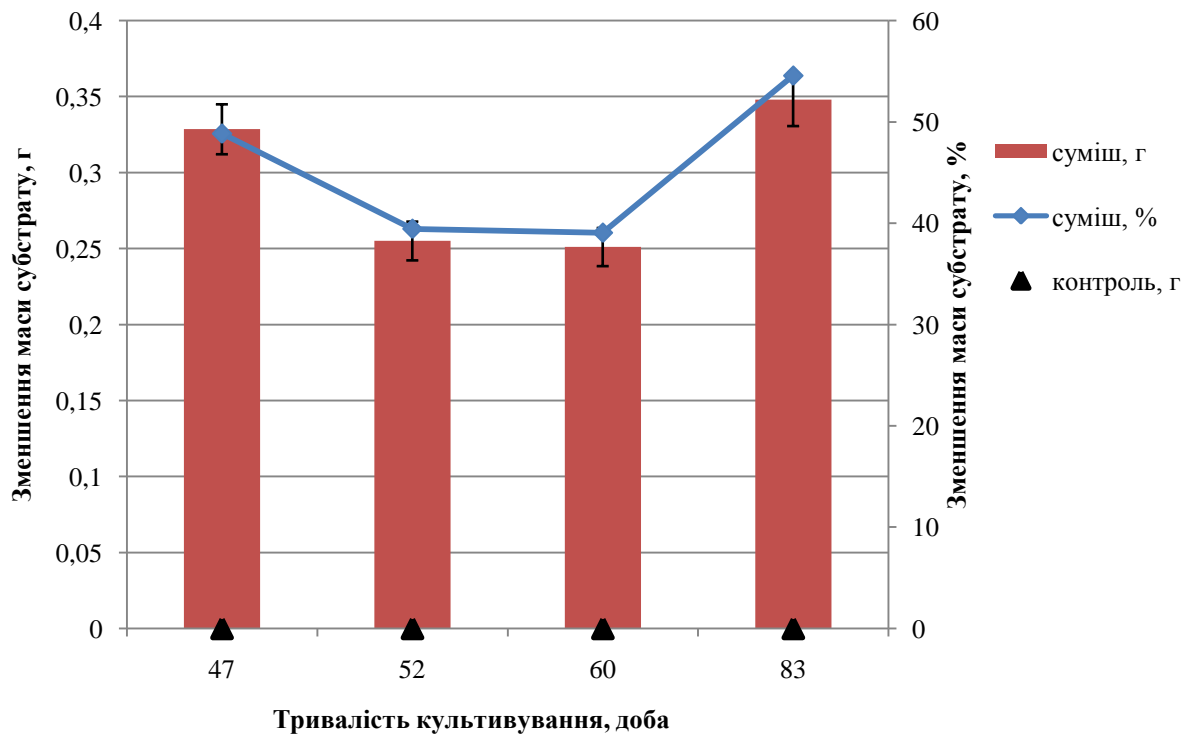


Рисунок 3.8 – Зменшення маси субстрату в г та у % при різній тривалості культивування суміші мікроорганізмів

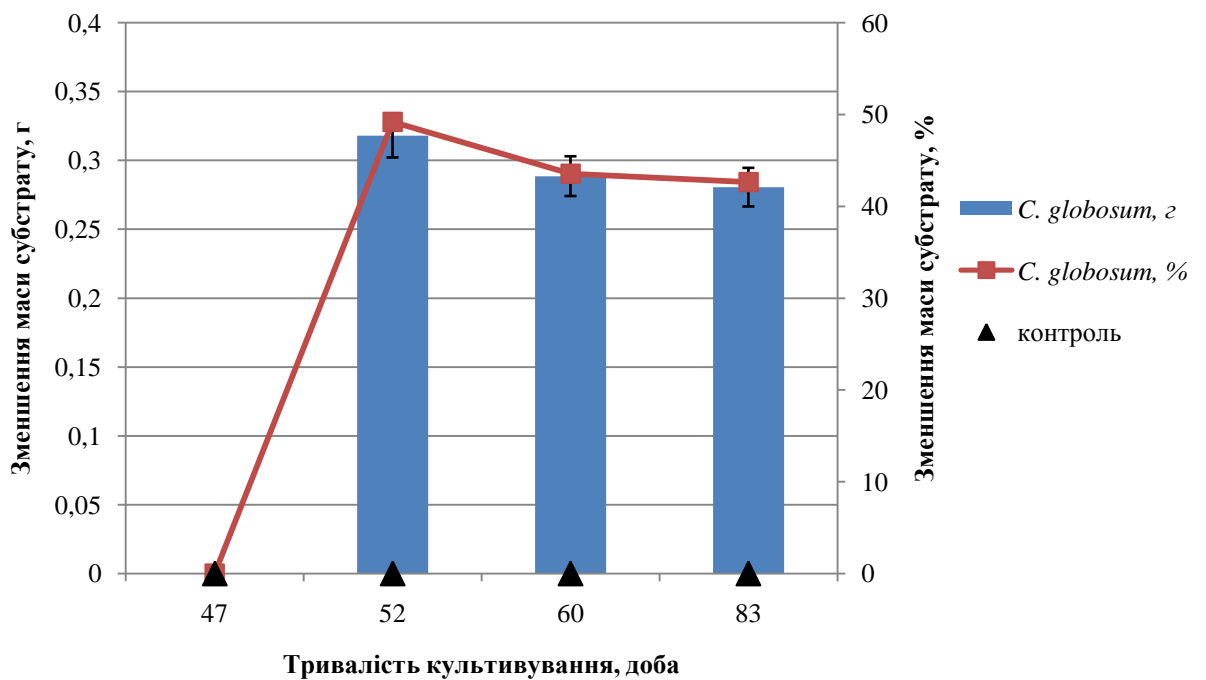


Рисунок 3.9 – Зменшення маси субстрату в г та у % при різній тривалості культивування *C. globosum*

За результатами дослідження найвищу ефективність розкладання целюлози має суміш мікроорганізмів, яка проявила целюлозодеградуючу здатність ще на 47 добі експерименту. Мікроміцет *Trichoderma viride* виявив целюлозоруйнуючу здатність лише на 83 добу експерименту, *Chaetomium globosum* – на 52 добу. Бактеріальний препарат не виявив целюлозоруйнуючої активності. Можна припустити, що целюлозоруйнуючі гриби та бактерії мають певні трофічні взаємозв'язки, які підвищують загальну целюлозолітичну активність суміші.

У відсотках станом на 83 добу експерименту, *C. globosum* розклав 42,7 % , суміш мікроорганізмів 54,6 %, *Tr. viride* 45,0 %, тобто у відсотковому співвідношенні суміш мікроорганізмів також має найвищі показники.

### 3.3 Побудова калібрувального графіка визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів

В таблиці 3.3 наведено вихідні дані для побудови калібрувального графіка для спектрофотометричного визначення КМЦ-активності (п. 2.4).

Таблиця 3.3 – Вихідні дані для побудови калібрувального графіка

№	Об'єм вихідного розчину глюкози, мл	Відповідний об'єм води, мл	Кількість глюкози, г	Маса глюкози, мг	Оптична густина
1	0	1	0	0	1,881
2	0,1	0,9	0,00016	0,16	1,727
3	0,2	0,8	0,00032	0,32	1,66
4	0,3	0,7	0,00048	0,48	1,335
5	0,4	0,6	0,00064	0,64	1,418
6	0,5	0,5	0,0008	0,8	1,218
7	0,6	0,4	0,00096	0,96	1,084
8	0,7	0,3	0,00112	1,12	0,938
9	0,8	0,2	0,00128	1,28	0,924
10	0,9	0,1	0,00144	1,44	0,619
11	1	0	0,0016	1,6	0,563

На основі отриманих значень оптичної густини будуюмо калібрувальний графік (рисунок 3.10): на осі ординат відкладаючи значення оптичних густин, а на осі абсцис – відповідні значення маси глюкози в мг.

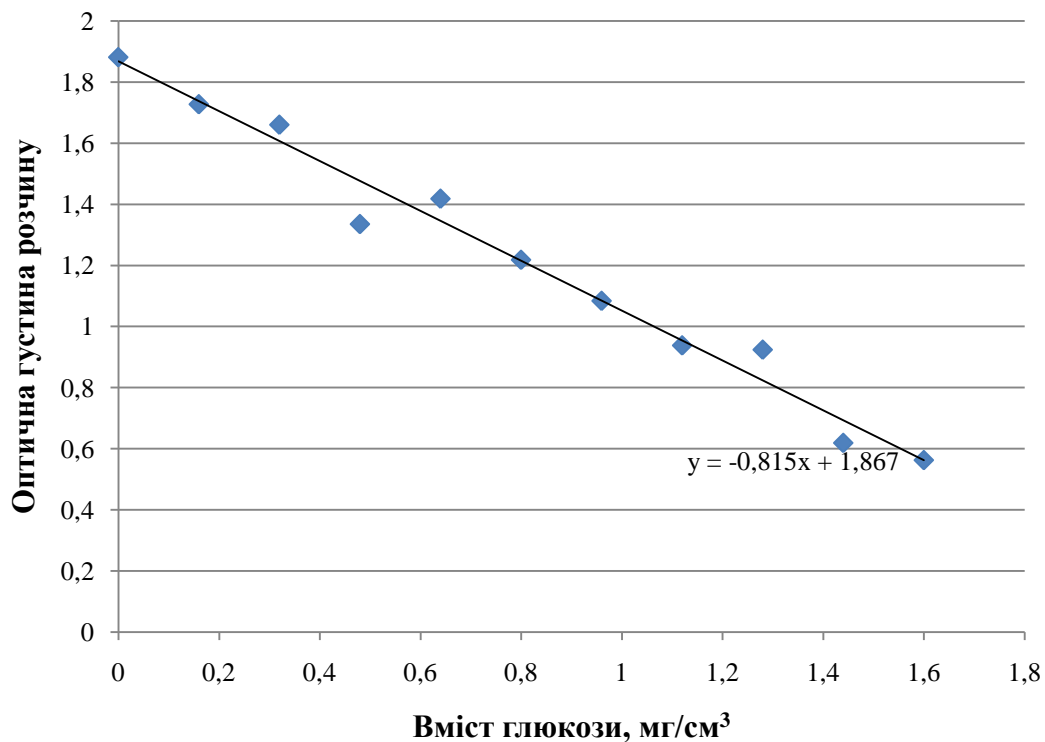


Рисунок 3.10 – Калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації глюкози

### 3.4 Результати визначення КМЦ-активності у досліджуваних видів мікроорганізмів

Для даного дослідження було культивовано 5 різних мікроорганізмів та 3 типи їхніх сумішей (рисунок 3.11).

Як видно з рисунку 3.11 візуально культуральні рідини не значно відрізняються, проте в деяких колбах, де присутні мікроміцети, спостерігається утворення пристінного кільця, на якому чітко видно міцелій, а в суміші бактерій утворилася характерна плівка бацил.

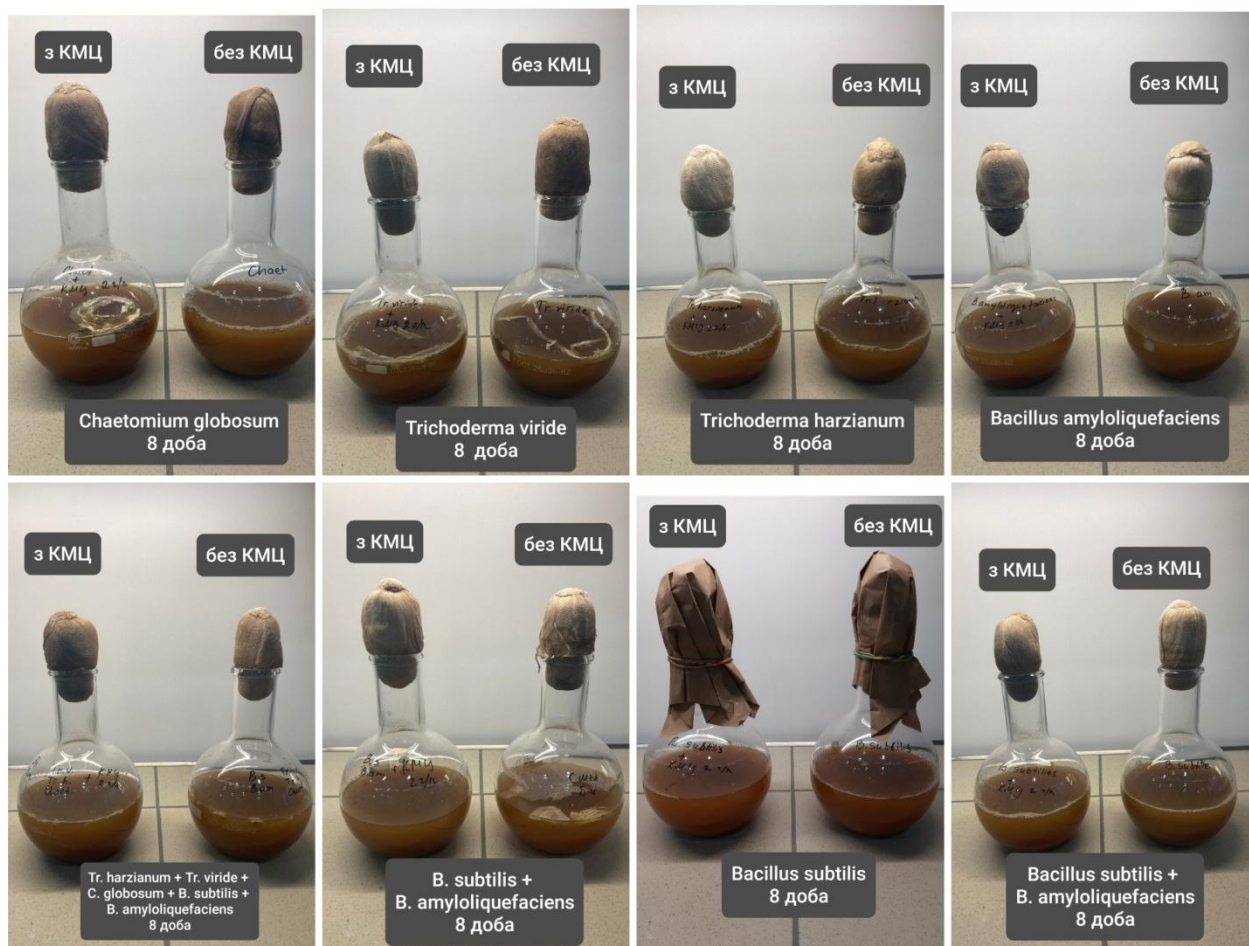


Рисунок 3.11 – Фото колб з досліджуваними культурами мікроорганізмів та їхніми сумішами на 8 добу культивування

Фугати культуральних рідин без додавання КМЦ були використані для подальшого визначення КМЦ-активності, результати якогонаведені в таблиці 3.5 та на рисунку 3.12.

Таблиця 3.5 – КМЦ-активність досліджуваних мікроорганізмів

	Оптична густина у початковомуфугаті	Оптична густина після взаємодіїфугат у з КМЦ	Вміст РР у початковомуфугаті, мг	Вміст РР після взаємодії фугату з кмц, мг	Активність, мкмоль/(см <sup>3</sup> ·хв)
<i>Bacillus subtilis</i>	0,278	0,889	1,94969	1,20000	0,049941922
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,161	0,967	2,09325	1,10429	0,044135787
<i>Bacillus subtilis</i>					

Продовження таблиці 3.5

<i>Trichoderma viride</i>	0,174	1,224	2,07730	0,78896	0,029568916
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>					
<i>Trichoderma harzianum</i>					
<i>Chaetomium globosum</i>					
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,282	0,768	1,94479	1,34847	0,056916155
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,285	0,597	1,94110	1,55828	0,066741922
<i>Chaetomium globosum</i>	0,302	0,59	1,92025	1,56687	0,067337423
<i>Trichoderma viride</i>	0,246	0,563	1,98896	1,60000	0,068242127
Контроль: вода + КМЦ	-	2,079		-0,26012	

Отже, найбільшою КМЦ-активністю володіють мікроміцети, що мають майже однакові результати, при цьому *Trichoderma viride* має першість з активністю 0,068 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв), *Chaetomium globosum* має активність 0,067 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв), а *Trichoderma harzianum* – 0,0667 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв). Ці дані повністю підтверджують літературні про те, що гриби є більш активними деструкторами целюлози, ніж бактерії.

Першість серед бактерій має *Bacillus amyloliquefaciens* з активністю 0,057 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв), що є доволі несподіваним результатом, оскільки в літературних даних саме *Bacillus subtilis* (активність – 0,050 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв)) є одним з найбільш продуктивних целюлозодеградуючих агентів.

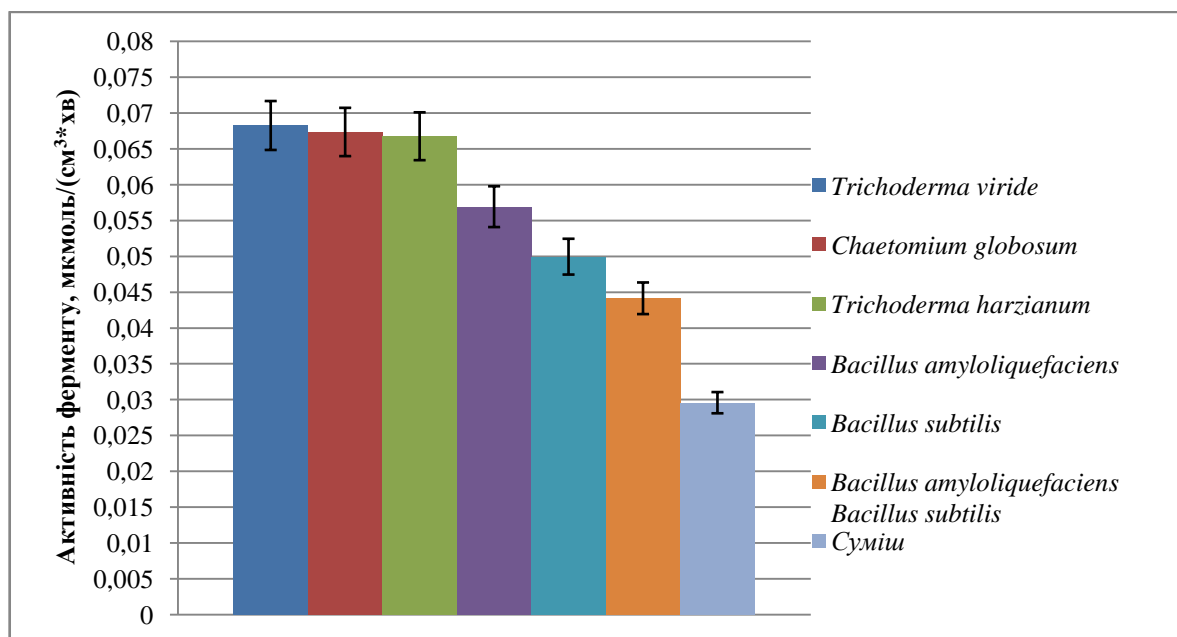


Рисунок 3.12 — КМЦ-активність ферментів мікроорганізмів та їх комбінацій

Найгірше в цьому досліді проявили себе суміші мікроорганізмів: суміш бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* та *Bacillus subtilis* має близьку активність целюлаз до активності *Bacillus subtilis* та складає 0,044 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв), що можна пояснити взаємоінгібуючою дією бацил. Найменшою целюлолітичною активністю (КМЦ-ктивністю) володіє суміш всіх задіяних в даному досліді мікроорганізмів (*Trichoderma viride*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Chaetomium globosum*). Їх сумарна КМЦ-активність складає 0,030 мкмоль/(см<sup>3</sup>·хв), що більше ніж вдвічі менше, за активність грибів. Пояснення цьому можна знайти в наступному досліді: візуальному визначенні ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату, в якому чітко видно, що бактерії роду *Bacillus* значно пригнічують ріст грибів.

### **3.5 Результати візуального визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату**

Вирощування мікроорганізмів на твердому ПС дозволяє спостерігати за активністю росту мікроорганізмів візуально та в загальному оцінити відношення мікроорганізмів до твердої целюлози як джерела вуглецю.

Крім того, завдяки висіванню кількох різних видів мікроорганізмів в одну чашку Петрі можна зробити висновки про взаємний вплив мікроорганізм на ріст і розвиток один одного, що важливо при створенні мікробних препаратів, що містять кілька різних видів мікроорганізмів.

Мікроорганізми висівали на чашки Петрі з середовищем Чапека (для грибів) та МПА(для бактерій та сумішей, в яких вони присутні).

На 5, 12 та 18 добу проводили візуальну оцінку активності росту мікроорганізмів, відмічаючи інтенсивність росту, поширення росту на целюлозний папір, наявність спороутворення у грибів, розкладання паперу.

На рисунку 3.13 зображений ріст мікроорганізмів на 5 добу культивування.

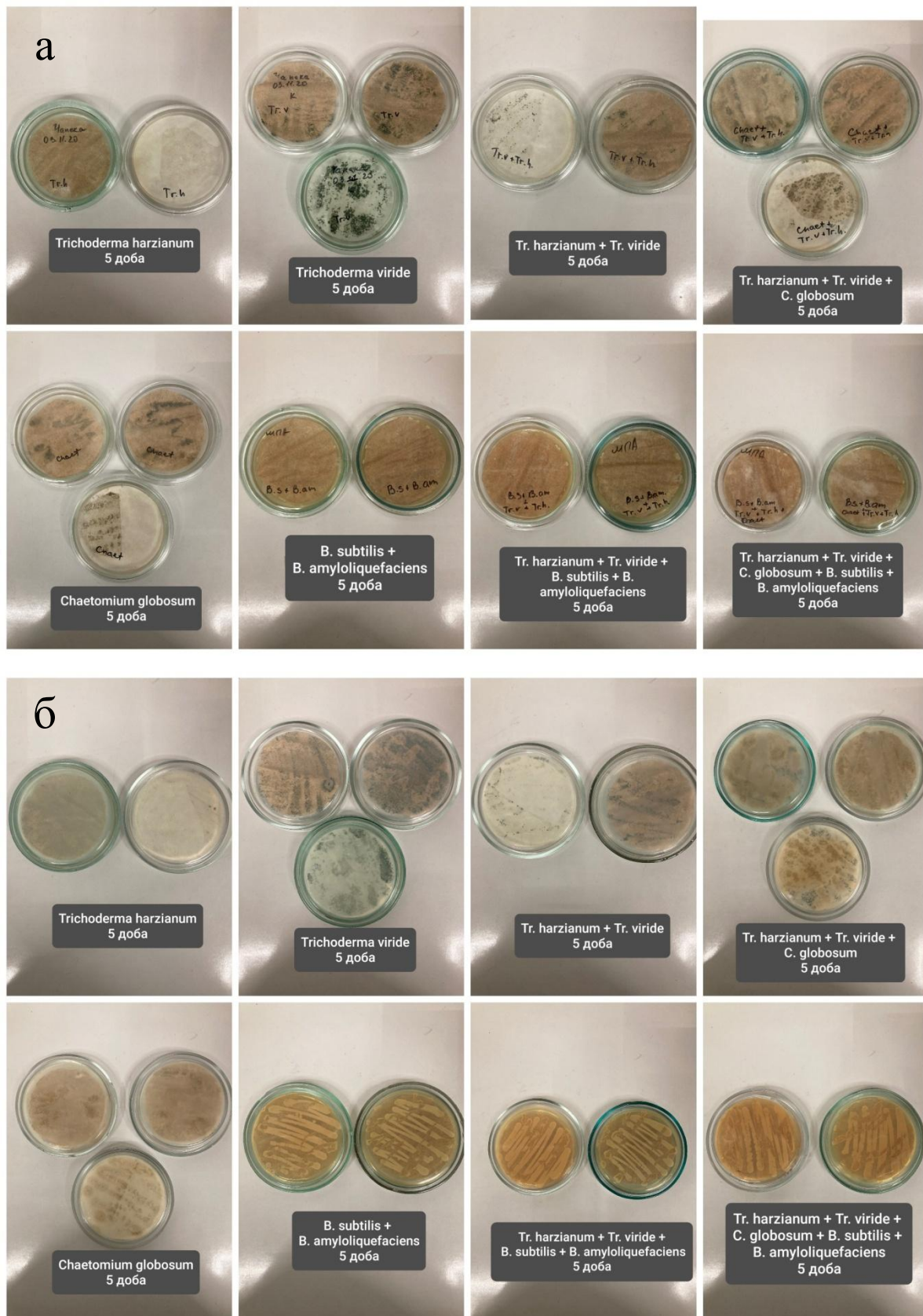


Рисунок 3.13 – Фото чашок Петрі з досліджуваними мікроорганізмами на 5 добу культивування: а) верх чашки; б) дно чашки

На даних рисунках можна побачити, що найгірше виросла культура *Trichoderma harzianum*, на обох чашках Петрі спостерігається поганий ріст порівняно з іншими мікроорганізмами. В той час як *Trichoderma viride* поширилася не лише по штриху, куди була нанесена, а й на більшу частину всієї чашки Петрі. Культура *Chaetomium globosum* також активно зростає, при тому не лише на чашках з монокультурою, а і в суміші з *Trichoderma viride* та *Trichoderma harzianum*. На чашках Петрі із двома культурами *Trichoderma* спостерігається незначний ріст мікроорганізмів.

Найцікавішим з точки зору сумісного вирощування та використання є пригнічення чи сповільнення росту грибів на чашках Петрі з бацилами. В комбінації *Bacillus amyloliquefaciens* та *Bacillus subtilis* з *Trichoderma* взагалі не спостерігається присутності мікроміцетів. Проте на обох чашках суміші всіх мікроорганізмів спостерігається міцелій гриба, після пересіву якого на інше поживне середовище, виявилось, що це *Chaetomium globosum*.

Наступним етапом є фотофіксація на 12 добу культивування, що представлена на рисунку 3.14.

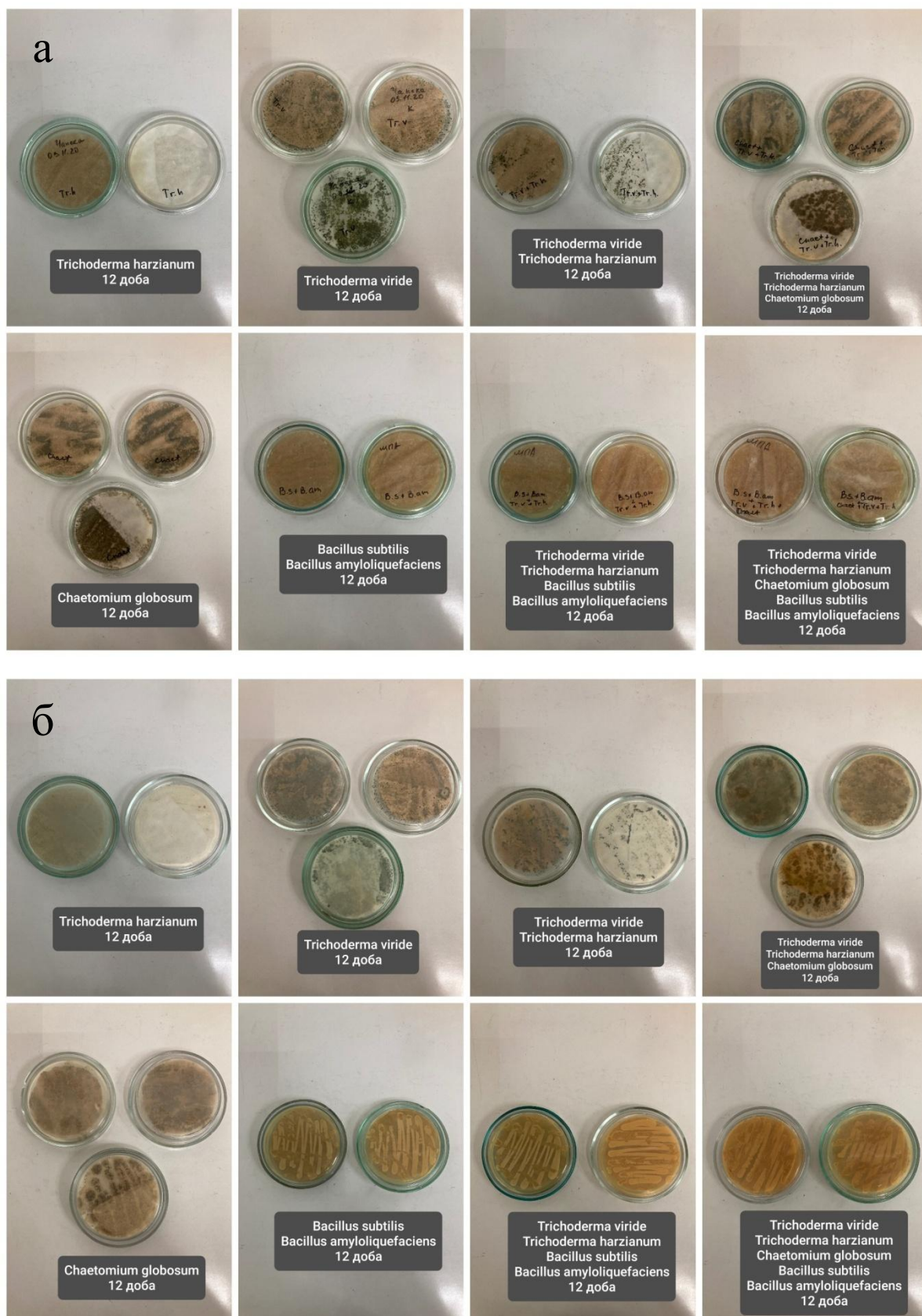


Рисунок 3.13 – Фото чашок Петрі з досліджуваними мікроорганізмами на 12 добу культивування: а) верх чашки; б) дно чашки

На 12 добу культивування спостерігаємо збільшення біомаси мікроорганізмів на чашках. На дні чашки з *Chaetomium globosum* чітко видно, що на тій частині чашки, де папір щільно прилягає до середовища ріст мікроорганізму інтенсивніший. У комбінаціях з *Bacillus amyloliquefaciens* та *Bacillus subtilis* мікроміцети так і не проявили високої інтенсивності росту.

Заключною є фотофіксація на 18 добу культивування, що представлена на рисунку 3.15.

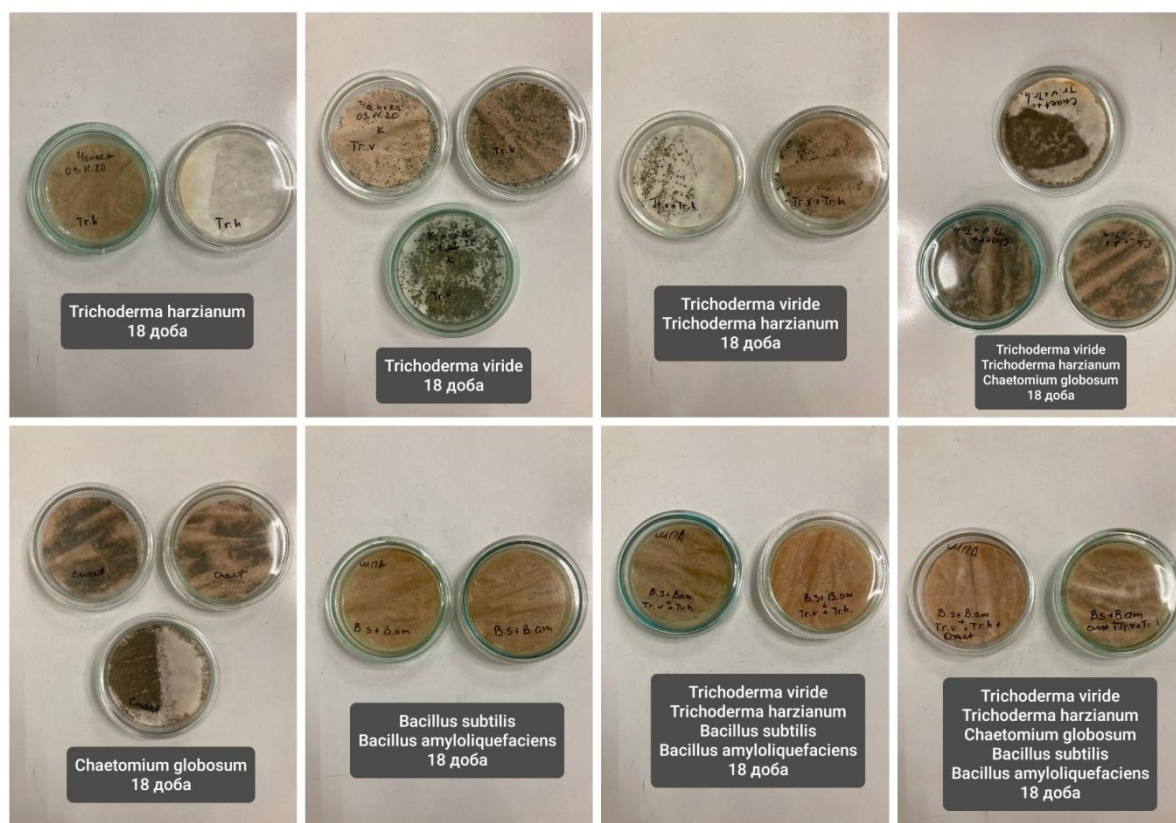


Рисунок 3.15а – Фото чашок Петрі з досліджуваними мікроорганізмами на 18 добу культивування (верх чашки)

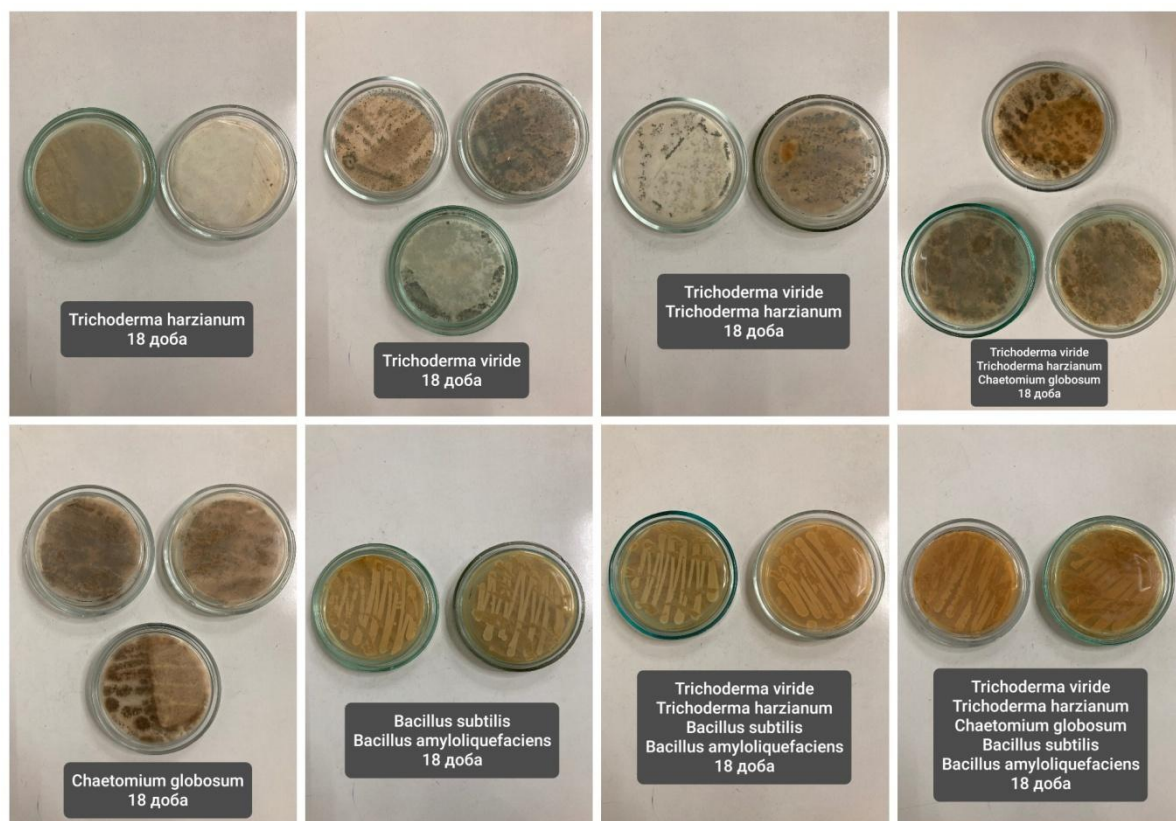


Рисунок 3.156 – Фото чашок Петрі з досліджуваними мікроорганізмами на 18 добу культивування (дно чашки)

Таблиця 3.6 – Зміна інтенсивності росту досліджуваних культур мікроорганізмів та їх сумішей в процесі культивування

Культури мікроорганізмів	Доба культивування		
	5	12	18
1. <i>Trichoderma harzianum</i>	+	-	-
2. <i>Trichoderma viride</i>	+++	+++	++
3. <i>Chaetomium globosum</i>	++	+++	+
Суміш 1 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	++	++	++
Суміш 2 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Chaetomium globosum</i>	+++	+++	+++

Суміш 3 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Гриби + Бактерії +++	Гриби + Бактерії -	Гриби + Бактерії -
Суміш 4 <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+++	+	+
Суміш 5 <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Гриби - Бактерії +++	Гриби - Бактерії -	Гриби - Бактерії -
Примітка. «-» ріст відсутній, «+» слабкий ріст, «++» помірний ріст, «+++» активний ріст			

### 3.6 Мікроскопічне дослідження обраних мікроорганізмів

Мікроскопія досліджуваних мікроорганізмів може дати уявлення про їх морфологічну будову та допомогти візуально охарактеризувати та відрізнити одне від одного потенційних продуцентів целюлолітичних ферментів.

Для сумішей мікроорганізмів мікроскопія дозволяє підтвердити чи навпаки спростувати інформацію те чи розвиваються ті чи інші мікроорганізми в даних умовах та в даному штучному угрупованні.

Важливе значення також мають морфологічні особливості, які можна виявити при мікроскопіюванні. Зокрема важливими є ознаки, які вказують на стадію росту чи розвитку досліджуваних організмів, а також зміни пов'язані з несприятливими умовами – стан міцелію, розмір клітин, спороношення грибів чи утворення ендоспор бактеріями тощо.

*Trichoderma harzianum* має конідіальне спороношення. Конідії забарвлені в блідо- та темнозелений колір, мають витягнуту форму, їх розміри  $2,5\text{—}4 \times 2\text{—}3,5$  мкм. Конідієносці пірамідальні з супротивними гілками у вузлах, з мутовками по 2 – 5 фіалід. Фіаліди флягоподібні  $5\text{—}8,5 \times 3\text{—}4,5$  мкм, гладкостінні. Хламідоспори зустрічаються рідко. Телеоморфа невідома.

На рисунку 3.16 зображено *Tr. harzianum*

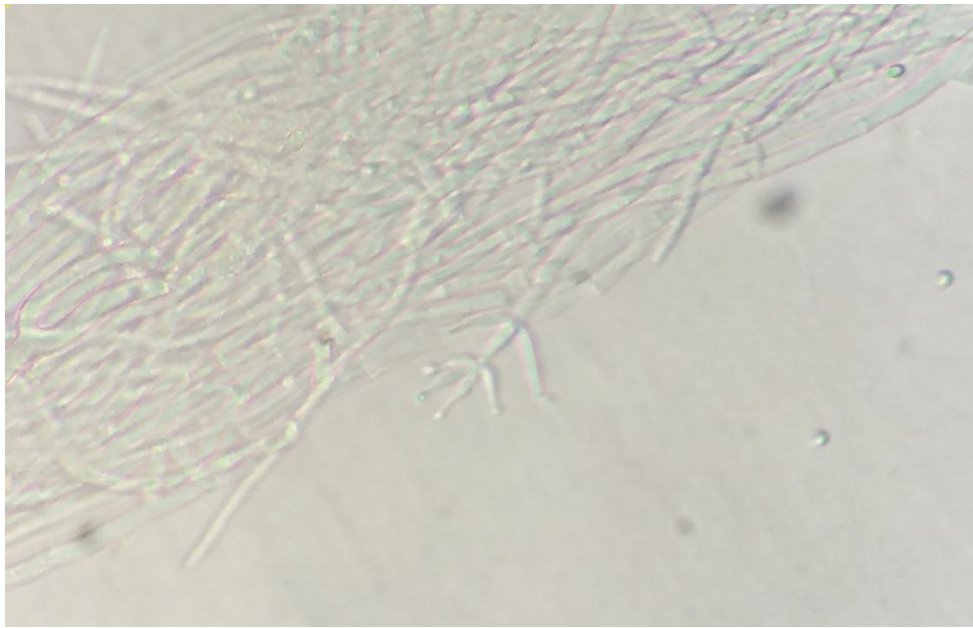


Рисунок 3.16 – Мікрофотографія препарату *Tr. harzianum*, збільшення окуляра  $10^{\times}$ , об'єктива  $40^{\times}$

*Trichoderma viride* також має конідіальне спороношення, конідієносці розгалужені, фіаліди флягоподібні  $8\text{—}14 \times 2,4\text{—}3$  мкм. Конідії забарвлені в темно-зелений або блакитно-зелений колір, еліпсоїдні  $4\text{—}4,8 \times 3,5\text{—}4$  мкм. На рисунку 3.17 представлена фотографія *Trichoderma viride*.



Рисунок 3.17 – Мікрофотографія препарату *Trichoderma viride*, збільшення окуляра 10<sup>x</sup>, об'єктива 40<sup>x</sup>

*Chaetomium globosum* має плодові тіла під назвою перитеції, які забавлені в зелено-оливковий колір та мають еліпсоїдну форму 140—270 × 100—240 мкм. На рисунку 3.18 зображено плодове тіло *Chaetomium globosum*.

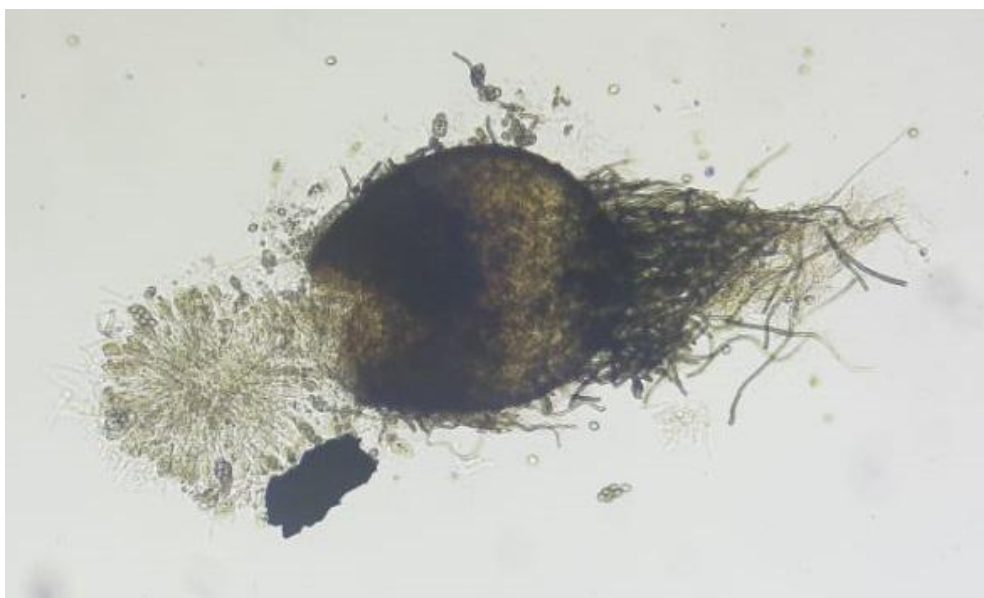


Рисунок 3.18 – Мікрофотографія препарату *Chaetomium globosum* (плодове тіло), збільшення окуляра 10<sup>x</sup>, об'єктива 40<sup>x</sup>

На стінках перитецію розташовані придатки, що можуть бути вигнуті, прямі чи закручені. Аскоспори лимоноподібні, коричневого кольору  $8,5\text{—}11 \times 7\text{—}9,5 \times 5,5\text{—}7$  мкм.

*Pseudomonas aureofaciens* грамнегативні палочки, мілкі, рухомі, поодинокі, фотографія представлена на рисунку 3.19.

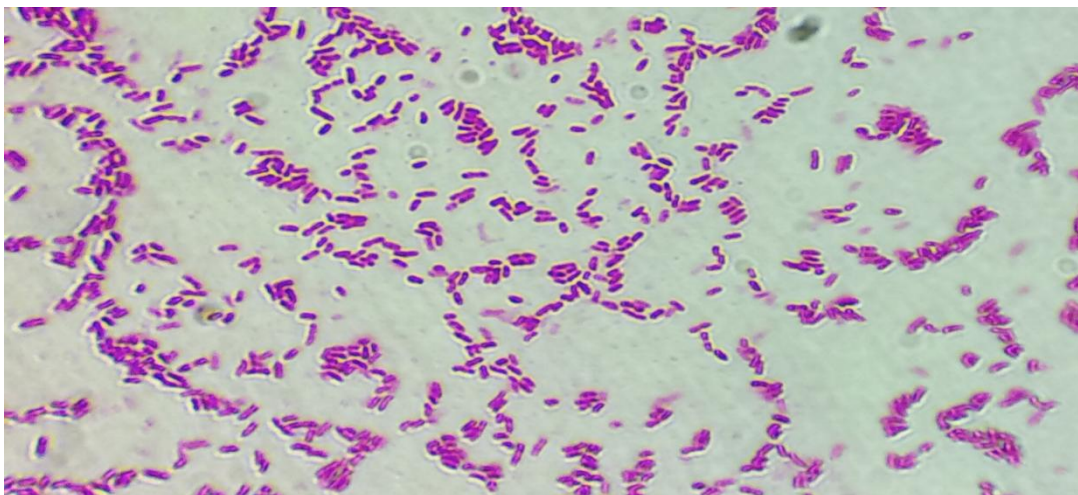


Рисунок 3.19 – Мікрофотографія препарату *Pseudomonas aureofaciens*, забарвлення за Грамом, збільшення окуляра  $10^{\times}$ , об'єктива  $100^{\times}$

*Pseudomonas fluorescens* (рисунок 3.20) – грамнегативна паличкоподібна бактерія, має 2 або більше джгутиків.

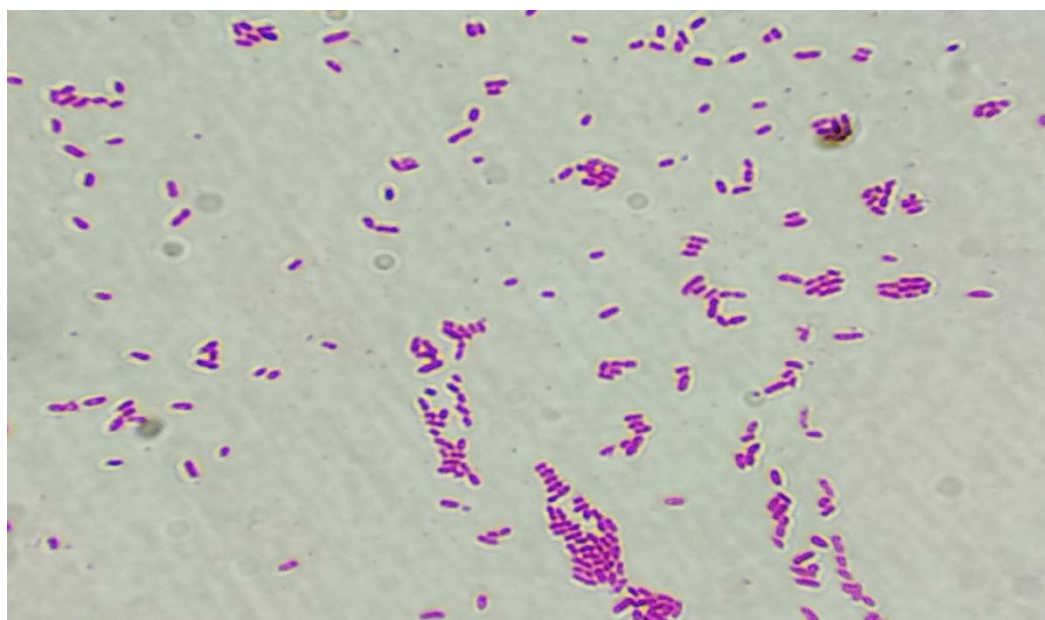


Рисунок 3.20 – Мікрофотографія препарату *Pseudomonas fluorescens*, забарвлення за Грамом, збільшення окуляра  $10^{\times}$ , об'єктива  $100^{\times}$

*Paenibacillus polymyxa* (рисунок 3.21) – граммпозитивна паличка розміром  $2\text{--}5 \times 0,6\text{--}0,8$  мкм, здатна утворювати спори, що перевищують розмір клітини.

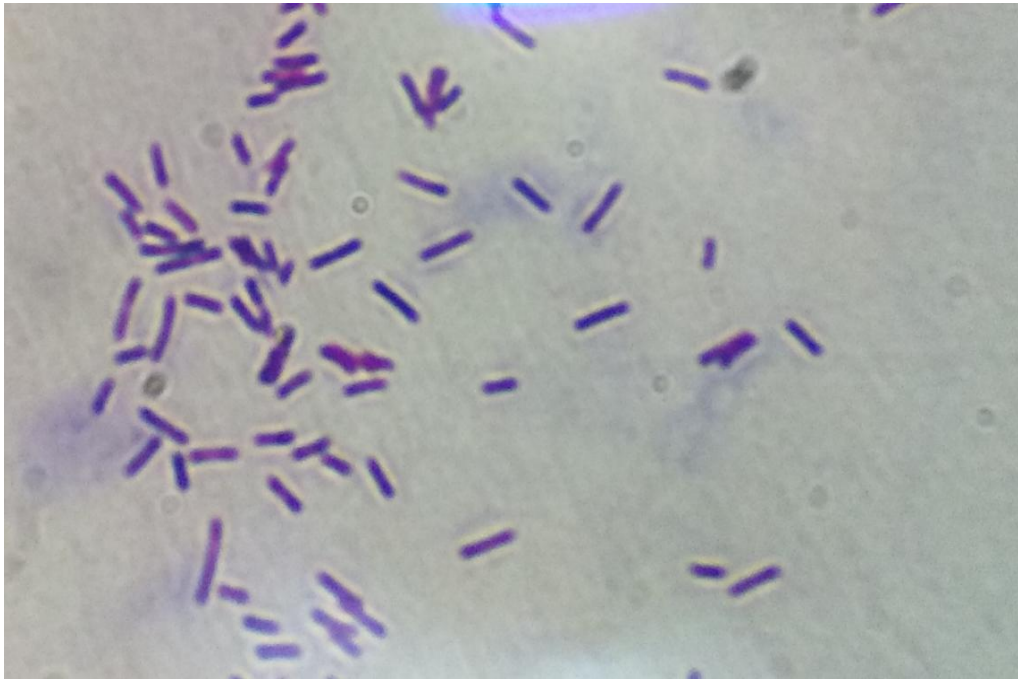


Рисунок 3.21 – Мікрофотографія препарату *Paenibacillus polymyxa*, забарвлення за Грамом, збільшення окуляра  $10^{\times}$ , об'єктива  $100^{\times}$

*Bacillus amyloliquefaciens* (рисунок 3.22)- це граммпозитивні ґрунтові бактерії, тісно пов'язані з видом *Bacillus subtilis*. Два види мають багато гомологічних генів і здаються настільки подібними, що візуально розділити два види неможливо. *Bacillus amyloliquefaciens* мають джгутики, що забезпечують рухливість. Подібно до інших видів *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* утворює ендоспори, що дозволяють вижити протягом тривалого періоду часу.

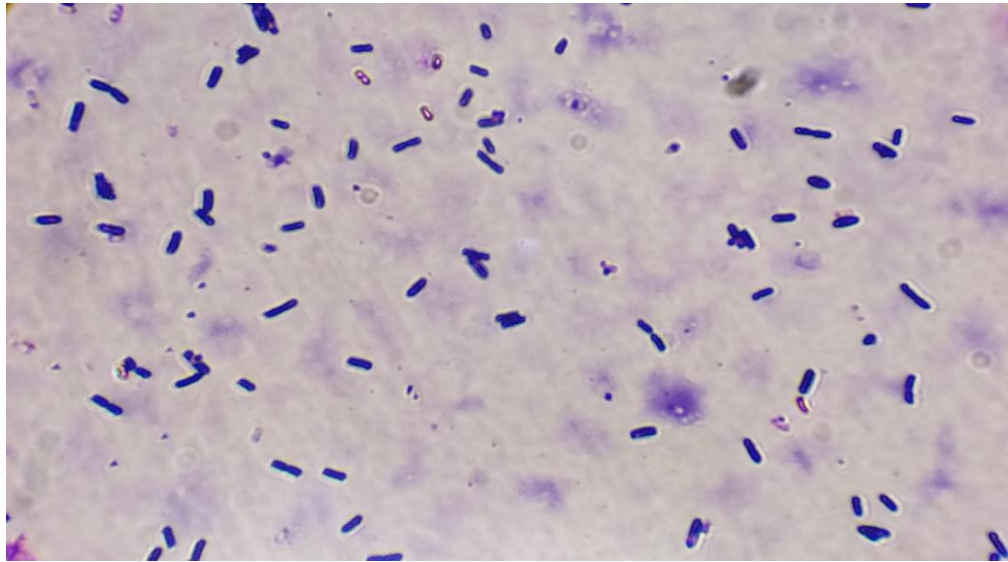


Рисунок 3.22 – Мікрофотографія препарату *Bacillus amyloliquefaciens*, забарвлення за Грамом, збільшення окуляра  $10^x$ , об'єктива  $100^x$

***Bacillus subtilis*** – паличкоподібна, рухома (має джгутики) грампозитивна бактерія розміром  $2\text{—}5 \times 0,4\text{--}0,6$  мкм. Утворює овальні ендоспори, що не перевищують розміри клітини. Фотографія мікроскопії наведена на рисунку 3.23.

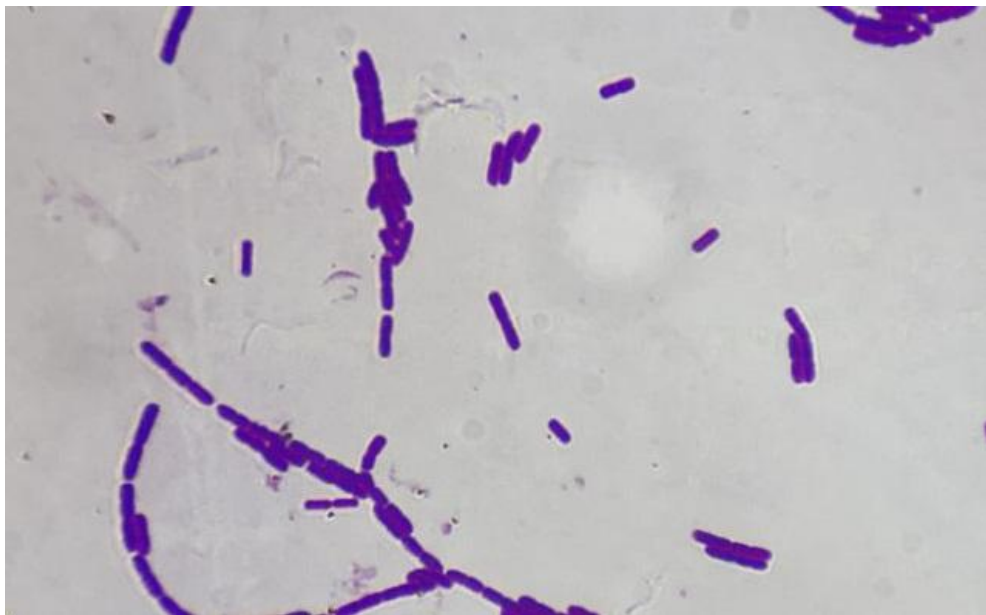


Рисунок 3.23 – Мікрофотографія препарату *Bacillus subtilis*, забарвлення за Грамом, збільшення окуляра  $10^x$ , об'єктива  $100^x$

Отже, за результатами проведених досліджень, можна зробити висновок, що мікроміцети проявляють себе як більш ефективні деструктори целюлози, на що вказують всі проведені дослідження.

Зокрема, при визначенні целюлозолітичної активності лунковим методом діаметр зони просвітлення для *Chaetomium globosum* і *Trichoderma harzianum* значно вищі ніж для бактерій (28-27 мм в порівнянні з 20 мм). Також для мікроміцетів характерна найвища КМЦ-активність, яка становить 0,067-0,068 мкмоль/см<sup>3</sup>·хв в порівнянні з 0,045-0,057 для бактерій.

Крім того, встановлено, що при використанні змішаних угруповань бактерій та грибів мікроміцетів целюлолітична активність щодо розкладання розчинних форм целюлози знижується і загалом є нижчою ніж для грибів та бактерій, що культивувалися окремо.

Тому обирати склад препарату-деструктора варто саме з *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum*. *Trichoderma harzianum* проявила себе неоднозначно, оскільки про дослідженні КМЦ-активності та в експерименті з визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату вона поступається *Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum*.

*Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum* є найбільш продуктивними мікроорганізмами, тому доцільно використовувати саме їх у складі препарату. Суміш *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* та бактерій роду *Pseudomonas* показала можливість застосування цих мікроміцетів в одному препараті, як і експеримент з визначення ефективності деструкції целюлози мікроорганізмами за використання паперового матеріалу як субстрату, де на чашках Петрі спостерігається суцільний ріст мікроорганізмів. Додатковою перевагою для використання цих мікроорганізмів є їх антагоністична активність відносно фітопатогенів, що можуть розвиватися на рослинних рештках.

## РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЄКТУ

### 4.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності

Бізнес-ідея: Інноваційний біопрепарат-деструктор целюлози.

Продукт: Препарат-деструктор целюлози, в склад якого входить суміш мікроорганізмів.

Суб'єкт замовлення: біотехнологічне агро-підприємство.

Об'єкт дослідження: Склад інноваційного біопрепарату-деструктора целюлози.

Мета наукової розробки: Метою даної розробки є отримання економічної вигоди внаслідок створення інноваційного біопрепарату на основі мікроорганізмів та подальшого продажу його на агроринку.

Асортимент продукції на початковому етапі представлений виключно біопрепаратом-деструктором целюлози, але в подальшому можливе розширення складу біопрепарату та розширення сфери його застосування.

Біопрепарат-деструктор – це комплекс мікроорганізмів у рідкому вигляді.

Призначення біопрепарату полягає у поліпшенні розкладання рослинних решток у ґрунті.

Механізм дії: до складу препарату входять мікроорганізми, які володіють комплексом корисних в агрономічному аспекті властивостей.

Перевірила: Ткаченко Т.П. \_\_\_\_\_  
(підпис)

Комплексна робота мікроорганізмів, що входять до складу препарату, дозволяє прискорити процеси розкладання органічних решток на полі, залишаючи у ґрунті вуглець та азот рослинного походження.

На додачу, препарат покращує фітосанітарний стан ґрунту за рахунок пригнічення патогенної мікрофлори та покращення родючості ґрунту, що сприяє підвищенню врожайності культурних рослин від 10 до 30 %

Спосіб використання: ручна або механічна обробка ґрунту або стерні.

**Продукт** планується випускати у вигляді рідкої суспензії мікроорганізмів  $1 \cdot 10^9$  КУО/мл. Тара: 1 дм<sup>3</sup>, 5 дм<sup>3</sup> та 10 дм<sup>3</sup>.

**Технологія** включає допоміжні роботи (підготовку повітря, комунікацій, поживного культивування мікроорганізмів з додаванням стримуючих агентів, стерильний розлив у первинну тару, наклеювання етикеток та пакування у вторинну тару.

**Персонал:** 25 осіб.

**Споживач:** потенційними споживачами є агрохолдинги та приватні фермерські підприємства, що займаються вирощуванням сільськогосподарських культур.

**Ринок збуту:** територія України, можливий експорт в країни Європи.

**Конкурентні переваги:** є вітчизняним продуктом з невисокою ціною з безпечних матеріалів.

**Плановий обсяг продукції за перший рік:** 36,1 т.

Таблиця 4.1 – Резюме стартап-проєкту

Критерій	Значення
1. Авторська сутність ідеї	Біопрепарат-деструктор целюлози
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Існують аналоги але дорожчі та з нищою ефективністю
3. Сутність розробленості технології реалізації	Існують підприємства на які можна впровадити дану технологію. Уже проводяться дослідження
4. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 1, а саме біологічні препарати для використання в промисловості та науці
5. КВЕД до якого може належати дане виробництво	Сільське господарство, лісове господарство та рибне, 01.1 Вирощування однорічних культур, 01.02 вирощування багаторічних культур, 01.6 Допоміжна діяльність у с/г 01.63 Післяурожайна діяльність
6. Очікувана потужність стартапу(мале пп, середнє. Велике)	Середнє або велике
7. За масштабом виробництва (одиничне, серійне, масове)	Серійне
8. За рівнем спеціалізації (вузькопрофільне, багатопрофільне, комбіноване)	Вузькопроф. ( с/г)
9. За ресурсами, що споживаються (працемістке, матеріаломістке, капіталомістке, інформаційномістке)	Працемістке, матеріаломістке
10. За чисельністю персоналу ( мале, середнє, велике)	Середнє, велике
11. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
12. Бажане географічне розташування <ul style="list-style-type: none"> <li>• Потужностей</li> <li>• Офісу стартапу</li> <li>• Збутової мережі</li> <li>• Постачальників комплектуючих</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Київська обл.</li> <li>• Київ ( поряд з потужностями)</li> <li>• Київська обл</li> <li>• Україна</li> </ul>
13. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	На етапі експлуатації
14. Бізнес-модель стартапу	B2B або B2B
15. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	«Біо-мінераліс», «Екостерн», «Деструктор стерні». Дані конкуренти знаходяться на стадії існуючого виробництва, що реалізує свою продукцію

16. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Про іноземних конкурентів інформації не знайдено
17. Ключові фактори успіху стартапу	Мікробний склад препарату-деструктора, екологічність, висока якість
18. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	Аграрний сектор промисловості та окремі споживачі (фізичні особи)
19. Споживачі на етапі розвитку	Аграрний сектор промисловості та окремі споживачі (фізичні особи)
20. Споживачі на етапі зрілості	Аграрний сектор промисловості та окремі споживачі (фізичні особи)
21. Конкурентна ціна на продукт стартапу	240 грн/л
22. Період повернення капіталовкладень у проєкт	3 роки
23. Джерела фінансування	Зовнішні, національне
24. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Мікроорганізми – 50 % Залишки поживного середовища – 40 % Тара – 10 %
25. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	ТОВ «ХІМСТАТУС УКРАЇНА» - хімічні реактиви, багаторазово Schulz-brewery – виробниче обладнання, одноразово ТОВ «ХЛР» - лабораторне оладнання, багаторазово Всі потенційні постачальники складових відчизняні
26. Планове місце реалізації результату розробки	Київська обл.
27. Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Можливе залучення дистриб'юторів, оплата діяльності – певний відсоток від продажів
28. Методи просування результатів розробки на ринок	Реклама

## 4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Таблиця 4.2 - Аналіз загрози і можливостей зовнішнього середовища

	Загрози	Можливості
<b>Економіка</b>		
Скорочення доходів споживачів	- Скорочення продажів за рахунок зниження споживчої здатності - Вимушене зменшення обсягів виробництва	- Можливість закріпитися на ринку за рахунок нижчої ціни на продукцію, ніж у конкурентів
Збільшення податкового навантаження	- Зменшення величини чистого прибутку - Зменшення попиту	- Пошук нових законних способів мінімізації податків
Збільшення рівня інфляції	- Знецінення грошей	- Отримання додаткових коштів на різниці в курсах валют
<b>Політика</b>		
Посилення державного контролю за охороною навколишнього середовища	- Можливе посилення державного контролю і над самим виробництвом (оскільки при виготовленні препарату також утворюються відходи)	- Зайняття вигідної позиції за рахунок екологічної безпеки
Відкриття ринку землі	- Продаж фермерської землі не під підприємства сільського господарства	- Збільшення попиту, оскільки про свою землю фермери піклуватимуться краще, ніж про орендовану
<b>Науково-технічний прогрес</b>		
Виявлення нових мікроорганізмів	- Збільшення можливості виникнення конкуренції	- Розширення асортименту - Патентування штамів
Застосування відходів рослинництва для отримання біопалива	- Зменшення попиту на продукцію	- Перепрофілювання виробництва на виготовлення біопрепаратів для розкладання пластику
Впровадження нової системи розпилення препаратів	- Розробка втрачає сенс, оскільки унікальність даного препарату в його структурі	- Зменшення собівартості за рахунок зменшення компонентів для виготовлення та спрощення технології
Механізація і автоматизація більшості технологічних процесів	- Моральне старіння існуючої технології	- Збільшення випуску продукції за рахунок впровадження

Географія		
Розташування виробництва в сільській місцевості	- Віддаленість від столиці - Складність транспортування сировини, матеріалів та готової продукції	- Безпосередня близькість до споживача
Демографія		
Еміграція населення, Старіння нації	- Зменшення кількості трудових ресурсів - Збільшення заробітної плати працівників	- Стимул для механізації виробництва
Культура		
Збільшення популярності екологічних товарів	- Збільшення конкуренції	- Збільшення зацікавленості споживача екологічно-безпечною продукцією
Необізнаність людей (фермерів) про біопрепарати	- Недовіра потенційного споживача до продукту	- Незнання негативних моментів застосування препарату

Таблиця 4.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Постачальники		
Нестабільні поставки сировини	пошук нових постачальників	перебої в постачанні призводить до збільшення собівартості продукції
Зростання цін на матеріали	пошук нових постачальників	перебої в сфері виробництва
Конкуренти		
Розширення асортименту	Введення нових видів продукції Ширша товарна диференціація	Зниження цін, зменшення обсягів продажу
Наявність високої конкуренції на ринку	Стимулювання розвитку виробництва	Невисокий прибуток

Споживачі		
Зростання вимог споживачів до якості продукції	Розширення асортименту продукції Покращення якості продукції, розробка нової програми просування товару на ринок	Неможливість швидкого реагування на запити споживачів
Консервативність покупців	Незнання негативних моментів застосування препарату	Недовіра потенційного споживача до продукту

Таблиця 4.4 - Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти внутрішнього середовища			
виробник	10	10	1,0
постачальник	10	2	0,2
споживачі	10	9	0,9
посередники	8	7	0,56
Суб'єкти зовнішнього середовища			
Політичні структури	8	5	0,4
суб'єкти економічного середовища	9	9	0,81
власники географічних об'єктів	8	9	0,72
суб'єкти демографії	9	6	0,54
суб'єкти культурного середовища	5	4	0,2
суб'єкти НТП	7	7	0,49

Таблиця 4.5 – Переваги та недоліки внутрішнього середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Організаційна структура	Раціональна організаційна структура підприємства	Віддаленість менеджменту від виробництва
Маркетинг	Ефективні канали поширення і просування	Високі витрати на створення іміджу
	Перевага в ефективності продукції	Висока ціна продукції
Виробництво	Можливість швидкого переналагодження устаткування	Низька завантаженість устаткування
	Висока конкурентоспроможність продукції	Слабка ремонтна база
	Ефективна система контролю якості	Наявність небезпечних для працівників ділянок виробництв
	Можливість розширення виробництва і як наслідок штату.	На початковому етапі можлива плінність кадрів.
Персонал	Власна база підготовки кадрів	Недосвідчений молодий персонал, високі витрати на підготовку кадрів
	Забезпечення роботою сільського населення, що знаходиться в безпосередній близькості до виробництва	Небажання міської освіченої молоді їхати на роботу в село
Фінанси	Наявність доходів у твердій валюті	Інфляційне знецінювання накопичень

### 4.3 Визначення ключових факторів успіху проєкту

Для більш наглядної оцінки технічного рівня продукту проєктуванні і аналогів, а також для більшої об'єктивності оцінки порівняємо дані готового товару методом Шонфільда.

Таблиця 4.6 – Оцінка характеристики за методом Шонфільда

№	Характеристики	Вагомість характеристики	Деструктор целюлози	препарат «Біо-Мінераліс»	Препарат «Екостерн»
1	Ціна	0,1	2	3	4
2	Ефективність засобу	0,3	5	5	3

3	Зручність застосування	0,3	5	2	3
4	Приємний зовнішній вигляд	0,1	4	5	3
5	Відповідність НТД	0,2	4	5	4
Характеристика		Бальна оцінка характеристик			
		Деструктор целюлози	Препарат «Біо-Мінераліс»	Препарат «Екостерн»	
1	Ціна	$0,1 \cdot 2 = 0,2$	$0,1 \cdot 3 = 0,3$	$0,1 \cdot 4 = 0,4$	
2	Ефективність засобу	$0,3 \cdot 5 = 1,5$	$0,3 \cdot 5 = 1,5$	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	
3	Зручність застосування	$0,3 \cdot 5 = 1,5$	$0,3 \cdot 2 = 0,6$	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	
4	Приємний зовнішній вигляд	$0,1 \cdot 4 = 0,4$	$0,1 \cdot 5 = 0,5$	$0,1 \cdot 3 = 0,3$	
5	Відповідність НТД	$0,2 \cdot 4 = 0,8$	$0,2 \cdot 5 = 1$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$	

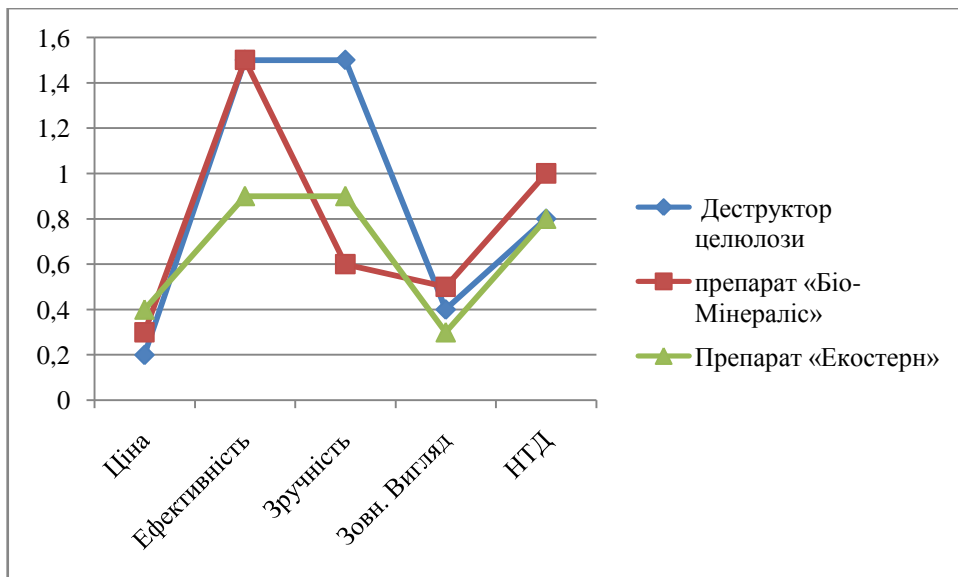


Рис.4.1 - Аналіз ключових факторів успіху проекту

Таким чином, можна сказати ключовий фактор успіху – зручність застосування. Загалом, показники деструктора целюлози свідчать про логічність, перспективність та цінність даного продукту. Показник, що вимагає подальшого вдосконалення – ціна.

*Таблиця 4.7– Варіанти розвитку ідеї стартапу*

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Інтеграція розробленої технології у існуюче виробництво біопрепаратів для сільського господарства	Інтеграція розробленої технології у існуюче виробництво біопрепаратів, при цьому беручи участь в подальшому розвитку технології, виробництва та підприємства в цілому
Продаж ідеї	В Україні існує багато підприємств з виробництва біопрепаратів, що мають власну матеріально-технічну базу. Можливо продати технологію виробництва такій компанії або запатентувати дану технологію. В результаті – отримання грошей від продажу, відсутність власного виробництва
Власне виробництво	Будування заводу, створення офісу та мережі збуту з нуля. Отримання прибутку від продажу препарату

#### 4.4 Визначення потенційних споживачів

За отриманими матеріалами формують «паспорт клієнта»

*Таблиця 4.8 – Класифікація потенційних споживачів*

1. Юридична особа	
Критерій	Значення
1. Форма власності (державне, приватне, колективне, комунальне, змішане, ...)	Колективне
2. КВЕД	Сільське господарство, лісове господарство та рибне, 01.1 Вирощування однорічних культур, 01.02 вирощування багаторічних культур, 01.6 Допоміжна діяльність у с/г 01.63 Післяурожайна діяльність
3. За потужністю (малі, середні, великі)	Середнє, велике
4. За масштабом виробництва (одиничні, серійні, масові)	Серійні
5. За рівнем спеціалізації (комбіновані, багатопрофільні, вузькопрофільні)	вузькопрофільні,
6. За ресурсами, що споживаються (працемісткі, матеріаломісткі, капіталомісткі, інформація)	Працемістке, матеріаломістке

Продовження таблиці 4.8

7. За чисельністю персоналу (малі, середні, великі)	Середнє, велике
8. За сферою діяльності (виробничі, комерційні, фінансові, посередницькі, страхові...)	Виробниче
9. За приналежністю капіталу і контролю (національні, іноземні, спільні багатонаціональні,...)	Національні
10. За географічним розташуванням	Київська обл.
11. За віддаленістю органів управління (національні, міжнародні, офшорні, транснаціональні,...)	Національні
12. За характером господарської діяльності (промислові, сільськогосподарські, транспортні, будівельні, фінансово-кредитні, страхові, туристичні, консалтингові,...),	Сільськогосподарські
13. За рівнем технологічної цілісності (провідні, дочірні, філії,...)	Провідні
14. За долею іноземного капіталу (з іноземними інвестиціями (більше 10%), іноземне підприємство (100%)).	З іноземними інвестиціями
15. За формуванням статутного капіталу (унітарні, корпоративні)	Унітарне
16. За організацією виробничих процесів (періодичні, безперервні)	Періодичне
17. За роботою протягом року (сезонні, позасезонні)	Сезонне
18. За географічним розташуванням на території України	Київ обл.
19. За наявністю вільних ОбЗ (коштів)	Велике, середнє
20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Регіон</li> <li>• Чисельність населення</li> <li>• Динаміка росту регіону</li> <li>• Структура регіону</li> <li>• Правові обмеження торгівлі</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Київська область</li> <li>• 1.725мільйнів</li> <li>• висока</li> </ul> Сільське господарство, мисливство та лісовегосподарство 22,4% Правових обмежень немає
<b>2. Фізична особа</b>	
1. Вік 0-4 5-10 11	Від 25-70

Продовження таблиці 4.8

<p>2. За сплатоспроможністю</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• До 500 грн/придбання</li> <li>• 501 - 1000</li> <li>• 1000 – 10000</li> <li>• 11000 – 30000</li> <li>• 31000 – 50000</li> <li>• 51000 – 100000</li> <li>• Більше 100000</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 501 - 1000</li> <li>• 1000 – 10000( залежно від кількості придбанного продукту)</li> </ul>
<p>3. За соціальним рівнем споживачів</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Кількість майна</li> <li>• Рівень зарплати</li> <li>• Доступ до ресурсів</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Задовільний</li> <li>• вище середнього</li> <li>• відкритий доступ до ресурсів</li> </ul>
<p>4. За способом життя (звички, традиції, стереотипи поведінки)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Фізичні</li> <li>• Психологічні</li> <li>• Емоційні</li> <li>• Духовні</li> <li>• Соціальні</li> <li>• Інтелектуальні</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Здоровий образ життя</li> <li>• Психологічно врівноважені</li> <li>• Врівноважені</li> <li>• будб-які релігійні погляди</li> <li>• соціально усвідомлені</li> <li>• інтелектуально розвинені</li> </ul>
<p>5. Тип особистості споживачів</p> <p>Традиціоналіст Ідеаліст Фрустрант (низька самооцінка) Реаліст Гедоніст (задоволення тут і зараз)</p>	<p>Ідеаліст</p>
<p>6. За ставленням до товару</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Мотивація придбання</li> <li>• Пошук вигоди</li> <li>• Ставлення до товару</li> <li>• Інформованість про товар</li> <li>• Інтенсивність споживання товару</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Пошук вигоди</li> <li>• Інформованість про товар</li> </ul>
<p>7. За сімейними цінностями</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Склад сім'ї</li> <li>• Рівень сімейного доходу</li> <li>• Етап життєвого циклу сім'ї</li> <li>• Традиції</li> </ul>	<p>Повна сім'я від 50000грн/міс зрілий бережливе та усвідомлене ставлення до навколишнього середовища</p>
<p>8. За співвідношенням бажання придбати і цінової межі (співставити цифри парами «місячний дохід – вартість одиниці товару»)</p>	<p>50000/200грн</p>

Продовження таблиці 4.8

9. За інтенсивністю споживання товару <ul style="list-style-type: none"> <li>• Разове придбання</li> <li>• Періодичне придбання</li> <li>• Систематичне придбання</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Періодичне придбання</li> <li>• Систематичне придбання</li> </ul>
10. За інформованістю <ul style="list-style-type: none"> <li>• Самоосвіта</li> <li>• ЗМІ</li> <li>• Спеціальні джерела</li> <li>•</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Спеціальні джерела</li> <li>• Самоосвіта</li> <li>• ЗМІ</li> </ul>

Таблиця 4.9 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
Агрохолдинги	Економія на добривах та дешева та вигідна утилізація власних відходів сільськогосподарської діяльності
Підприємства пов'язані з сільським господарством (середні та малі)	Економія на добривах та дешева та вигідна утилізація власних відходів сільськогосподарської діяльності, також можливість отримання зелених тарифів для підприємств що самостійно утилізують власні відходи.
Фізичні особи	Економія на добривах та дешева та вигідна утилізація власних відходів

Таблиця 4.10 – Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	Значення	Примітки
Організаційно-правова форма	товариство з обмеженою відповідальністю, господарське товариство	
Класифікація -за потужністю -за чисельністю персоналу -за обсягом виробництва -за сезонністю виробництва -інше	-Середнє – Мале та Середнє (100 осіб) – Багатотонажне – сезонне	
Розташування -місто -сміт -село -інше	-місто -сміт -село	
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Продукт що принесе економію на відходах та потенційну вигоду	

Призначення придбаної розробки -за призначенням -інше	За призначенням	
Кваліфікація персоналу підприємства -робочі -службовці -керівники	- робочі – молодший спеціаліст - керівники – рівень «магістр» за спеціальність «агрономія», «захист рослин» біотехнологія та споріднені	
Потенційний обсяг споживання розробки -одиниця -1-5 -інше	Від 1 л до багатотонажної поставки	
Хто приймає рішення про придбання розробки (узагальнена характеристика працівника)	Працівник що займає керуючу посаду	

Таблиця 4.11– Запланований обсяг реалізації стартап-продукту (товарів, послуг).

	Січень, 2021	Лютий, 2021	Березень, 2021	Квітень, 2021	Травень, 2021	Червень, 2021	Липень, 2021	Серпень, 2021	Вересень, 2021	Жовтень, 2021	Листопад, 2021	Грудень, 2021
Запланований Обсяг, т	-	-	0,1	2	2	3	5	10	12	2	-	-

Оскільки і виробництво препарату, і його застосування є сезонним, то на зимові місяці не планується реалізація продукції.

#### 4.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Таблиця 4.12– Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	Кількість, од.	Ціна, грн/од.	Кількість, од.	Ціна, грн/од.
Деструктор целюлози	36 100	250	50 000	220

## 1. Витратний метод.

$Ц = С + \text{фіксований відсоток прибутку (від собівартості) [грн/од]}$   
(або середня норма прибутку по даному виду товару),

де Ц – прогнозована ціна товару, грн/од,

С – розрахована автором ідеї, технології, методики очікувана собівартість товару, грн/од.

$$Ц = С + \%С = \frac{7\,220\,000}{36\,100} + 25\% = 200 + 50 = 250 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн., %П – відсоток прибутку, % П = 20%.

## 2. Параметричний метод

$$\begin{aligned} Ц_{\text{нової моделі}} &= Ц_{\text{базової моделі}} \cdot \frac{\text{Балова оцінка нової моделі}}{\text{Балова оцінка базової моделі}} \\ &= 220 \cdot \frac{60 * 0,4 + 95 * 0,4 + 99 * 0,2}{95 * 0,4 + 95 * 0,4 + 70 * 0,2} = 243 \left[ \frac{\text{грн}}{\text{од}} \right] \end{aligned}$$

де Ц <sub>нової моделі</sub> - ціна ідеї, технології, розробки, за якою автор пропонуватиме її на ринку, грн/од.,

Ц <sub>базової моделі</sub> - ціна прототипу, аналогу, які вже існують на ринку, грн/од.,

Балова оцінка нової моделі - експертна оцінка (у балах) характеристик нової ідеї, технології, методики при їх застосуванні самим експертом в ході дослідного випробування; виставляється з урахуванням коефіцієнту вагомості даної характеристики у переліку ключових характеристик товару,

Балова оцінка базової моделі - експертна оцінка (у балах) характеристик аналогу, прототипу, які вже існують на ринку з урахуванням коефіцієнту вагомості даної характеристики у переліку ключових характеристик товару

Таблиця 4.13 – Балова оцінка

Продукт	Параметри						ціна
	Зручність використання		Ефективність		Зовнішній вигляд		
	бали	Коефіцієнт вагомості	бали	Коефіцієнт вагомості	бали	Коефіцієнт вагомості	Одного балу =220/(60·0,4+ 95·0,4+99·0,2) = 2,7
Препарат «Біо-Мінераліс»	60	0,4	95	0,4	99	0,2	220
Деструктор целюлози	95	0,4	95	0,4	70	0,2	2,7·(95·0,4+ 95·0,4+70·0,2) = 243

### 3. Метод конкурентних цін.

$$Ц = \frac{Ц_{x1} + Ц_{x2} + Ц_{x3}}{N} = \frac{208 + 230 + 223}{3} = 220,33 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн.,  $Ц_{x1,x2,x3}$  – ціни конкурентів «Екостерн», «Біо-Мінераліс», «Органік-баланс»), грн., N – кількість використаних цін конкурентів.

Для ціноутворення був обраний витратний метод, оскільки за рахунок ускладнення технології виготовлення товар має більшу собівартість, а цей метод її враховує, але при цьому ціна залишається конкурентноздатною відносно аналогів на ринку.

Капіталовкладення

$$K = 11\,540\,664 \text{ грн}$$

Річний прибуток (при ціні 250 грн/л)

$$П = Ц - С = 36\,100 \cdot 250 - 36\,100 \cdot 200 = 1\,805\,000 \text{ грн/рік}$$

Рентабельність:

$$P = П/С \cdot 100\% = (1\,805\,000 / 7\,220\,000) \cdot 100\% = 25\%$$

Розрахуємо час повернення капіталовкладень:

$$T_{пов} = \frac{K}{П}$$

$$T_{пов} = 11\,540\,664 / 1\,805\,000 = 6 \text{ років}$$

Таблиця 4.14– Калькуляція собівартості стартап-продукту

№ п/п	Етап розробки / елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1	Етап розробки ідеї -сировина, матеріали -амортизація -заробітна плата і нарахування -ЄСВ -електроенергія -паливо -інше Всього	- - - - - - - -	0 грн/міс
2	Етап впровадження (дослідного випробування) -сировина, матеріали -амортизація -заробітна плата і нарахування (ЄСВ) -електроенергія -паливо -інше	2 т 5% 26 осіб 22% 30000 кВт/год 100 л	30 000 грн/міс 100 000 грн/міс 229 000 грн/міс 50 820 грн/міс 74 220 грн/міс 2 876 грн/міс
3	Етап виходу на планову потужність -сировина, матеріали -амортизація -заробітна плата і нарахування (ЄСВ) -електроенергія -паливо -інше	2 т 5% 25 осіб 22% 15000 кВт/год 100 л	50 000 грн/міс 75 000 грн/міс 229 000 грн/міс 50 820 грн/міс 37 110 грн/міс 2 876 грн/міс

Таблиця 4.15– Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
Розташування заводу	Будівлі	500 000	20 років	Існуючий завод в Київській області	Власні і державні кошти, кошти інвесторів

Продовження таблиці 4.15

Виробничий процес	<i>Машини і обладнання</i>	500 000	15 років	Існуючий завод в Київській області/ Італія	Власні і державні кошти, кошти інвесторів
	<i>Виробничий інвентар</i>	200 000	5 років	Існуючий завод в Київській області	Власні і державні кошти, кошти інвесторів
Масова реалізація	<i>Транспортні засоби</i>	300 000	7 років	Існуючий завод в Київській області	Власні і державні кошти, кошти інвесторів

Таблиця 4.16– Забезпеченість проекту оборотними фондами

<b>Група ОбФ</b>	<b>Назва</b>	<b>Норма витрат на рік</b>	<b>Ціна, грн/од</b>	<b>Очікуваний постачальник</b>	<b>Джерело фінансування</b>
Сировина і матеріали	Сировина	18 т	25000 грн/т	Україна	Власні кошти
	Матеріали	6 т	25000 грн/т	Україна	Власні кошти
Паливо, електроенергія	Паливо	100 л	28,76 грн/л	Україна	Власні кошти, інвестори
	Електроенергія	15000 кВт/год	2,474 грн/кВт/год	Україна	Власні кошти, інвестори

Таблиця 4.17– Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

<b>Категорія кадрів</b>	<b>Назва посади</b>	<b>Чисельність за списком на посаді</b>	<b>Кваліфікаційні вимоги</b>	<b>Плановий рівень заробітної плати, грн</b>	<b>Джерело фінансування ФОП</b>
Робочі основні	Оператор автоматичних та напівавтоматичних систем	5	Професійно-технічна освіта. Стаж роботи за спеціальністю – не менше 1 року	7000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності

Продовження таблиці 4.14

	Електрик	1	Базова або неповна вища освіта відповідного напрямку підготовки (бакалавр або молодший спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – не менше 1 року	9000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності
	Водій	1	Повна загальна середня освіта. Професійно-технічна освіта (навчальний заклад з підготовки <b>водіїв</b> транспортних засобів).	9000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності
Робочі допоміжні	Прибиральник	1	Без вимог до стажу роботи.	7000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності
Спеціалісти	Інженер-технолог	2	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – не менше 1 року	10000	гранти
	Технік-технолог	2	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – не менше 1 року	10000	Дохід від реалізації
	Мікробіолог	2	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст).	10000	гранти

Продовження таблиці 4.17

	Бухгалтер	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – не менше 2 років	10000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності
	Менеджер комерційного відділу	3	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – не менше 1 року	9000	Дохід від реалізації
Молодший персонал обслуговування	лаборант	3	Без вимог до стажу роботи.	8000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності
Керівники	Керівник з якості	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – на посадах керівників нижчого рівня не менше 2 років	12000	прибуток, одержаний від попередньої діяльності
	Керівник відділу виробництва	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – на посадах керівників нижчого рівня не менше 5 років	12000	гранти

Продовження таблиці 4.17

	Керівник комерційного відділу	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи за спеціальністю – на посадах керівників нижчого рівня не менше 2 років	12000	Дохід від реалізації
	Керівник фінансового відділу	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи на посадах керівників нижчого рівня — не менше 5 років.	12000	Доходи від фінансових операцій
	Завідуючий складськими приміщеннями	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст). Стаж роботи на посадах керівників нижчого рівня — не менше 5 років.	12000	Дохід від реалізації

#### 4.6 Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів реалізації проєкту

Таблиця 4.18 - Карта бізнес-процесів виконання стартап-проєкту

Стадія реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Обговорення можливості реалізації ідеї	-	1 день	0,00 грн
	Збір початкової інформації про сільське господарство на ринку України	Інтернет	2 дні	

Продовження таблиці 4.18

	Визначення типу деструктора целюлози	Інтернет та сучасні дослідження	2 дні	
	Оцінка ціни готової культури	Інтернет, онлайн сайти	2 дні	
	Зробити прогноз фінансових показників	-	2 дні	
	Скласти план організації виробництва	-	3 дні	
	Визначення структури доходів	-	5 днів	
	Визначення структури витрат	-	5 днів	
	Залучення інвесторів	-	1 місяць	
Реалізація ідеї	Підписання контрактів та договорів	Робота керівництва	2 місяці	2 500 000
	Закупівля матеріалів	Робота керівництва	2 місяці	
	Налагодження необхідної інфраструктури	Робота персоналу	3 місяці	
	Закупівля необхідного обладнання та потужностей	Робота керівництва	3 місяці	
	Виробниче тестування технології та введення в експлуатацію	Робота персоналу	1 місяць	
Впровадження у виробництво	Закупка запасних частин	Робота керівництва	2 місяці	480 000
	Вироблення продукції	Робота персоналу	2 місяці	

Продовження таблиці 4.18

Масова реалізація	Реклама в інтернеті SEO A words	Робота SEO майстра	2 місяці	2 880 000
	Транспортування у мережі продажу с/г продукції та склади онлайн магазинів	Робота водія та грузчиків	1 рік	
	Пошук нових шляхів збуту	Робота керівництва	1 рік	
	Вироблення продукції	Робота персоналу	1 рік	
	Продаж продукції	Робота менеджерів комерційного відділу	1 рік	

Таблиця 4.19 - Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи											
	Керівник відділу виробництва	Бухгалтер, Керівник фінансового відділу	Інженер-технолог, технік-технолог	Керівник комерційного відділу, Менеджер комерційного відділу	Оператор автоматичних та напівавтоматичних систем	Керівник якості	Електрик	Водій	Лабоант	Завідуючий складськими приміщеннями	Мікробіолог	Прибиральник
Визначити політику і цілі розвитку організації	+											
Проінформування персоналу і передача інформації	+											

Продовження таблиці 4.19

Аналіз зі сторони керівництва	+					+						
Прийняття коригуючих і попереджуючих рішень	+		+							+		
Визначення потреб в ресурсах			+	+						+		
Забезпечення ресурсами		+								+		
Управління персоналом	+		+									
Управління інфраструктурою			+	+								
Планування	+			+								
Процеси вивчення потреб споживача				+		+						
Проектування і розробка продукції	+		+								+	
Процес закупівлі		+								+		
Виробництво продукції і надання послуг			+		+				+		+	
Управління приладами для вимірювання і контролю			+		+		+					
Підтвердження відповідності продукції						+						
Підтвердження відповідності управління підприємством	+											
Постійні покращення	+		+			+						
Ведення документації		+				+						
Ведення веб сторінки				+								
Контроль та регулювання роботи електричних приладів, ремонт							+					

Транспортування сировини, матеріалів, продукції та персоналу									+				
Контролювання справності транспортних засобів									+				
Забезпечення необхідного ступеню чистоти виробничих приміщень													+

#### 4.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними

Таблиця 4.20– Ризики інноваційної розробки

Назва процесу/стадії реалізації стартап-проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	неефективна стратегія інноваційної діяльності підприємства	Ринковий ризик	Інформаційний ризик
	Диспропорції у виробництві.	Системний ризик	Виробничий ризик
Реалізація ідеї	неефективний підбір відповідних маркетингових стратегій пропагування	Ризик бізнес-подій	Торговий ризик
Впровадження у виробництво	неефективний підбір технологій	Науково-технічний ризик	Техніко-технологічний ризик
	Неповне чи несвоєчасне постачання матеріалів.	Товарний ризик	Ресурсний ризик

Масова реалізація	брак необхідних для реалізації інноваційних проєктів коштів	Інвестиційний ризик	Кредитний ризик
	погіршення фінансового стану підприємства	Інфляційний ризик	Фінансовий ризик

Таблиця 4.21 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
<b>Зовнішні ризики</b>			
Системний ризик	Диспропорції у виробництві.	С	С
Ринковий ризик	неефективний підбір відповідних маркетингових стратегій пропагування	Н	С
Інфляційний ризик	погіршення фінансового стану підприємства	С	В
Товарний ризик	Неповне чи несвоєчасне постачання матеріалів.	В	С
Науково-технічний ризик	неефективний підбір технологій	Н	В
Інвестиційний ризик	брак необхідних для реалізації інноваційних проєктів коштів	С	В
Інфляційний ризик	погіршення фінансового стану підприємства	С	С
<b>Внутрішні ризики</b>			
Інформаційний ризик	неефективна стратегія інноваційної діяльності підприємства	Н	С

Продовження таблиці 4.21

Фінансовий ризик	погіршення фінансового стану підприємства	С	В
Ресурсний ризик	Неповне чи несвоєчасне постачання матеріалів.	С	В
Технікотехнологічний ризик	неефективний підбір технологій	Н	В
Ресурсний ризик	Неповне чи несвоєчасне постачання матеріалів.	С	С
Кредитний ризик	брак необхідних для реалізації інноваційних проєктів коштів	С	В

Таблиця 4.22– 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			
Середній рівень впливу	2		Диспропорції у виробництві, Неповне чи несвоєчасне постачання матеріалів.	погіршення фінансового стану підприємства, брак необхідних для реалізації інноваційних проєктів коштів
Низький рівень впливу	1			неефективний підбір технологій

Таблиця 4.23– План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Диспропорції у виробництві	Прийняття ризику	Директор, бухгалтер	тиждень	Запозичення (кредитування) – отримання кредитів та позик, державних дотацій для компенсації збитків та відновлення виробництва;
погіршення фінансового стану підприємства	Попередження (скорочення) ризику	Директор, бухгалтер, маркетолог	2 тижні	Зниження частоти збитку, Зменшення розміру збитків, – Активний цілеспрямований маркетинг
Неповне чи несвоєчасне постачання матеріалів	Прийняття ризику	Директор бухгалтер	2 дні	Створення резервів (в натуральній або грошовій формі (фондів самострахування або фондів ризику))
неефективний підбір технологій	Ухилення від ризику	Біотехнолог Директор Інженер	тиждень	Відмова від прийняття ризикованих проєктів, рішень
брак необхідних коштів для реалізації інноваційних проєктів	Передача ризику	Бухгалтер директор	5 днів	– Спонсорство.

## **РОЗДІЛ 5. ВИМОГИ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ І ОХОРОНИ ПРАЦІ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ**

До роботи в лабораторії допускаються співробітники, які мають відповідну кваліфікацію, пройшли вхідний інструктаж з техніки безпеки та охорони праці, ознайомилися з планом евакуації та розміщення засобів пожежогасіння.

При організації роботи потрібно керуватися вимогами ДСТУ ГОСТ 12.0.230:2008 Система стандартів безпеки праці. Системи управління охороною праці. Загальні вимоги (ГОСТ 12.0.230-2007, IDT).

Перед початком роботи з обладнанням працівники мають ознайомитися з інструкцією, а також, за потреби пройти інструктаж або навчання.

Облаштування робочих місць та приміщень загального користування повинні відповідати вимогам пожежної безпеки та електробезпеки. Плани евакуації та засоби пожежогасіння повинні знаходитися у всіх приміщеннях. Всі електричні прилади, мають бути заземлені.

Всі реактиви повинні зберігатися в герметично закритій тарі в спеціально-обладнаних приміщеннях. Вся тара, в якій зберігаються реактиви повинна мати відповідні написи з зазначенням речовини, класу чистоти та іншої необхідної інформації.

При роботі в лабораторії працівники повинні користуватися засобами індивідуального захисту в відповідній комплектації залежно від виду робіт, що виконуються.

Враховуючи специфіку роботи в мікробіологічній лабораторії, при організації роботи потрібно дотримуватися вимог ДСТУ 7748:2015 Безпека праці. Біологічна безпека. Загальні вимоги.

## ВИСНОВКИ

- 1) Молекула целюлози є полімерною молекулою із ступенем полімеризації близько 14 000 і молекулярною масою приблизно 500 000, яка складається з залишків  $\alpha$ -D-глюкози. Целюлоза відносно важко піддається біодеградації в природному середовищі оскільки більшість живих організмів не мають відповідних ферментів. Біохімічна деструкція целюлози до глюкози відбувається під дією целюлолітичних ферментів, які розділяють на 4 типи: ендо-1,4- $\beta$ -глюканази, екзо-целобіогідролази, екзо-1,4- $\beta$ -глюкозидази, целобіази.
- 2) Целюлолітичні ферменти виявлено у цілому ряду мікроорганізмів, що належать до різних доменів. Розщеплювати целюлозу здатні деякі види бактерій, що належать до родів *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Clostridium* та багатьох інших. Серед грибів найбільш активними продуцентами целюлаз є роди: *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Cladosporium*. Різні види мікроорганізмів можуть мати цілий комплекс целюлолітичних ферментів або ж лише окремі типи ферментів.
- 3) Проведено дослідження на виявлення активності целюлолітичних ферментів у обраних мікроорганізмів-деструкторів: *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum*. Відповідно до отриманих експериментальних даних більшість досліджуваних мікроорганізмів проявляють целюлозолітичну активність і окремо, і в штучно створених угрупованнях, проте гриби виявилися більш ефективними деструкторами целюлози.

При визначенні целюлозолітичної активності лунковим методом діаметр зони просвітлення для *Chaetomium globosum* і *Trichoderma harzianum* значно вищі ніж для бактерій (28-27 мм в порівнянні з 20 мм).

Для грибів характерна найвища КМЦ-активність, яка становить для *Trichoderma viride* – 0,068 мкмоль/см<sup>3</sup>·хв, *Chaetomium globosum* – 0,067 мкмоль/см<sup>3</sup>·хв в порівнянні з 0,045- 0,057 мкмоль/см<sup>3</sup>·хв для бактерій.

- 4) Встановлено, що при використанні змішаних угруповань бактерій та мікроміцетів целюлолітична активність щодо розкладання розчинних форм целюлози знижується і загалом є нижчою ніж для грибів та бактерій, що культивувалися окремо.
- 5) Узагальнені результати проведених досліджень свідчать про те, що для розкладання рослинних відходів доцільно використовувати мікробний препарат, до складу якого входять мікророміцети *Trichoderma viride* та *Chaetomium globosum*. Також є можливим застосування обох мікроорганізмів у якості окремих препаратів для деструкції, оскільки вони демонструють значну активність целюлаз.
- 6) Проведено мікроскопічне досліджування мікроорганізмів, а саме: *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* та описано їх морфологічні особливості.
- 7) Розроблено стартап-проект, продуктом якого є біологічний препарат-деструктор рослинних решток. Ціна продукту: 250 грн/л, рентабельність: 25 %; період повернення капіталовкладень: 6 років.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сергійчук М. Г. Мікробіологія : Підруч. для студ. вищ. навч. закл. / М. Г. Сергійчук, В. К. Позур, А. І. Вінніков, Т. М. Фурзікова, Н. М. Жданова.— К.: Нац. ун-т ім. Т. Шевченка, 2005. — 375 с. — Бібліогр.: с. 374-375.
2. Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М. С. Гиляров; Редкол.: А. А. Бабаев, Г. Г. Винберг, Г. А. Заварзин и др. — 2-е изд., исправл. — М.: Сов. Энциклопедия, 1986.
3. Нечаев А.П. Пищевая химия: учебник / А.П. Нечаев, С.Е. Траубенберг, А.А. Кочеткова // 2-е издание, переработанное и исправленное. — СПб.: ГИОРД, 2003. — 640 с
4. Рабинович М. Л., Мельник М.С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биологической химии, 2000. — № 40. С. 205-266.
5. Анкудинова Н. В. Биохимические и физико-химические свойства ключевой тополитической эндоглюканазы целлюлазноо комплекса *Chaetomium cellulyticum*: дис. кандидата хімічних наук: 2000/ Н. В. Анкудинова, 2000. — 116 с.
6. Клёсов А. А. Ферментативный катализ: учеб. пособие для хим. спец. ун-тов. Ч. 1/А. А. Клёсов, И. В. Березин — М.: Московский государственный университет, 1980. — 264 с.
7. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина. Химия, ультраструктура, реакции. / пер. с англ. А.В. Оболенской и З.П. Ельницкой. Москва : Лесная промышленность, 1988. — 512 с.

8. Сеницын А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов [Текст] / А. П. Сеницын, А. В. Гусаков, В. М. Черноглазов. - Москва : Изд-во МГУ, 1995. – 219 с.
9. Коваленко А. Деструкція решток. Ефективність деструкторів стерні у сівозміні в умовах південного степу // The Ukrainian Farmer – липень, 2019 [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://btu-center.com/publication/detail.php?id=5237>
10. Нілова Н. Біодеструктор стерні – ефективний засіб регулювання розкладанням поживних решток / Нілова Н., Новохацький М., Болоховська В., Ростоцький О. // № 11 (86) листопад 2016 р. науково-виробничий журнал «Техніка і технології АПК»
11. Невмержицька О.М. Пошук мікроорганізмів для біодеградації целюлозовмісної сировини з вторинних ресурсів і відходів сільського господарства / О.М. Невмержицька, Н.О. Васильєва, А.К. Нурмухаммедов // Наукові праці інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків, випуск 19, 2013. – с. 90 – 92.
12. Борзова Н. В. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості / Н. В. Борзова, Л. Д. Варбанець // Biotechnology. - 2009. - Vol. 2, № 2. - С. 23-41.
13. Ястремська Л. С. Целюлолітичні мікроорганізми доменів Bacteria и Archaea / Л. С. Ястремська. – [Електронний ресурс]. – //Проблеми екологічної біотехнології. – 2015. – №2. – Режим доступу до статті: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/9620>. – Problems of Environmental Biotechnology
14. Емцев В. Т. Микробиология: учебник для академического бакалавриата/ В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин// 8-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2018. — 445 с.

15. Домарацький Є. О. Застосування біодеструкторів целюлози – елемент біологізації технології вирощування соняшнику/ Є. О. Домарацький, О. О. Домарацький, О.П. Козлова// Матеріали VI Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Сучасне матеріалознавство та товарознавство: теорія, практика, освіта» 14-15 березня 2019 р. Полтава, 2019. – С. 247-255.
16. Цехмістер, Г. В. Антагоністична активність ґрунтових мікроорганізмів, як ефективний засіб захисту рослин від акремоніозу/ Г. В. Цехмістер, А. С. Кислинська, А. А. Павленко// Сільськогосподарська мікробіологія, 30, 2019. – 46-53.
17. Лысак, В.В. Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 430 с.
18. Копилов Є. П. Ґрунтові гриби як біотичний чинник впливу на рослини / Є. П. Копилов // Сільськогосподарська мікробіологія. - 2012. - Вип. 15-16. - С. 7-28.
19. Асоціація грибів *trichoderma harzianum* для одержання біоорганічного добрива пат. 114247 Україна : МПК А01D С05F 17/00, С12N 1/14, С12R 1/885. № а 2015 11528 ; заявл. 23.11.2015 ; опубл. 10.05.2017, Бюл. № 9.
20. Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Яковлева И.В. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение // Вестник ОрелГАУ № 3 (24), 2010. – С.36-39.
21. Хусид, С. Б. Подсолнечная лузга как источник получения функциональных кормовых добавок / С. Б. Хусид, А. Н. Гнеуш, Е. Е. Нестеренко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. –2015. – № 107. – С. 142-155.
22. Пати́ка В. П., Копилов Є. П., Скуловато О. В. Целюлозолітична активність ґрунтового гриба *Chaetomium globusum* // Вісник

- Уманського національного університету садівництва. “Мікробіологія”.  
– 2016. – № 1. – С. 27- 30.
23. Глускіна Т. С. Пошук продуцентів лігноцелюлозолітичних ферментів /  
Т. С. Глускіна З. Г. Піх // Вісник Національного університету  
“Львівська політехніка”: Хімія, технологія речовин та їх застосування.  
– 2002. – № 461 – С. 183-191.
24. Кривомаз Т. І. Визначення шкодочинності грибів для вирішення  
проблем екобезпеки дерев’яних конструкцій в будівництві /  
Т. І. Кривомаз, А. Р. Перебинос // Екологічна безпека та збалансоване  
ресурсокористування. – 2016. – № 1. – С. 101-110.
25. Лобанок А. Г. Микробный синтез на основе целлюлозы: Белок и другие  
ценные продукты/ А. Г. Лобанок, В. Г. Бабицкая, Ж.Н. Богдановская//  
Мн.: Наука и техника. – 1988, — 261 с.—ISBN 5-343-00283-8.
26. Дем'янюк О.С. Екологічні основи функціонування мікробіоценозів  
грунту агроєкосистем в умовах змін клімату [Текст] : автореф. дис. д-ра  
с.-г. наук : 03.00.16 / Дем'янюк Олена Сергіївна ; Нац. акад. аграр. наук  
України, Ін-т агроєкології і природокористування. - Київ, 2017. - 44 с.
27. Домарацький Є.О. Агроєкологічне обґрунтування системного  
застосування багатофункціональних рістрегулюючих препаратів при  
виросуванні польових культур в Південному Степу [Текст] : автореф.  
дис. д-ра с.-г. наук : 06.01.09 / Домарацький Євгеній Олександрович ;  
Держ. ВНЗ "Херсон. держ. аграр. ун-т". - Херсон, 2019. - 44 с.
28. Методичні вказівки до проведення практичних (семінарських) занять  
та до виконання самостійної роботи з курсу «Основи мікробіології» для  
студентів напряму підготовки 6.040106 “Екологія, охорона  
навколишнього середовища та збалансоване природокористування” /  
Укл. В.В. Вембер – 2012. – 85 с.
29. Зубов Д. В., Толченев А. А. Экспресс-методика контроля активности  
ферментного комплекса // Вестник СГТУ. 2012. №2с (64).

30. Тодосійчук Т.С. Загальна біотехнологія: Метод. вказівки до викон. лаб. робіт для студентів напряму 6.051401 – „Біотехнологія” / Уклад. Т.С.Тодосійчук, І.Р.Клечак, Л.П.Дзигун, М.А.Григор’єва.– К.: НТУУ «КПІ».
31. ГОСТ 5903-89. Изделия кондитерские. Методы определения сахара. – М: Стандартиформ. – 1989. – 26 с.
32. Економічна частина магістерської дисертації: розроблення стартап-проекту: [Електронний ресурс]: навч. посіб. для студ. спеціальності 151 «Автоматизація та комп’ютерно-інтегровані технології» та спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / О.А. Підлісна, Ю.В. Тюленєва ; КПІ ім. Ігоря Сікорського. – Електронні текстові дані (1 файл: 0,2 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 32 с.
- 33.Lakhundi S. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections / S. Lakhundi, R. Siddiqui, N.A. Khan // Parasites Vectors. - № 8 (23). –2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0642-7>.
- 34.Chandra R. Microbial degradation of lignocellulosic waste and its metabolic products / R. Chandra, S. Yadav, V. Kumar // Environ. Waste Manag. – 2016. – P. 249-293.
35. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. 2-е изд. Минск: Вышэйш. школа, 1976. - 288 с

## ДОДАТОК А

### Склад поживних середовищ, що використовуються в дослідженні

Таблиця А.1 – Склад м'ясо-пептонного агару

Компонент	Кількість
М'ясний екстракт	До 1 дм <sup>3</sup>
Натрію хлорид	5 г
Пептон сухий ферментативний	10 г
Агар мікробіологічний	13 г

Таблиця А.2 – Склад кукурудзяно-мелясного середовища

Компонент	Кількість
Вода дистильована	1 дм <sup>3</sup>
Меляса бурякова	22-23 г/ дм <sup>3</sup>
Кукурудзяний екстракт	23-23 г/ дм <sup>3</sup>
Дріжджовий екстракт	0,02 г/ дм <sup>3</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 г/ дм <sup>3</sup>

Таблиця А.3 – Склад солодового агару

Компонент	Кількість
Вода дистильована	1 дм <sup>3</sup>
Солодовий екстракт	30 г/ дм <sup>3</sup>
Агар мікробіологічний	15 г/ дм <sup>3</sup>

Таблиця А.4 – Склад манітно-дріжджового середовища

Компонент	Концентрація
Вода дистильована	1 дм <sup>3</sup>
Магнію сульфат	0,8 г/ дм <sup>3</sup>
Натрію хлорид	0,2 г/ дм <sup>3</sup>
Хлорид заліза (III)	0,01 г/ дм <sup>3</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 г/ дм <sup>3</sup>
Дріжджовий екстракт	2,0 г/ дм <sup>3</sup>
Маніт	5,0 г/ дм <sup>3</sup>
Глюкоза	5,0 г/ дм <sup>3</sup>

Таблиця А.5 – Склад середовища Чапека

Компонент	Кількість
Вода дистильована	1 дм <sup>3</sup>
Магнію сульфат семиводний	0,5 г/ дм <sup>3</sup>
Калію хлорид	0,5 г/ дм <sup>3</sup>
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,01 г/ дм <sup>3</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 г/ дм <sup>3</sup>
Сахароза	30 г/ дм <sup>3</sup>
Агар мікробіологічний	15 г/ дм <sup>3</sup>
NaNO <sub>3</sub>	3 г/ дм <sup>3</sup>