



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ТУЗЕНКО Анастасії Вячеславівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез целюлаз *Trichoderma harzianum*

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

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Trichoderma harzianum*, цільовий продукт: фермент целюлаза

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу технологічна схема біосинтезу целюлаз *Trichoderma harzianum* формату А2 – 1 аркуш, апаратурна схема біосинтезу целюлаз *Trichoderma harzianum* формату А2 – 1 аркуш

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.25 – 08.03.25	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	08.03.25 – 16.03.25	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.03.25 – 24.03.25	
4	Біосинтез цільового продукту	24.03.25 – 02.04.25	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	02.04.25 – 10.04.25	
6	Опис технологічної схеми	10.04.25 – 19.04.25	
7	Специфікація обладнання	19.04.25 – 27.04.25	
8	Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	27.04.25 – 06.05.25	
9	Контроль виробництва	06.05.25 – 14.05.25	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	14.05.25 – 21.05.25	
11	Виконання графічної частини	21.05.25 – 28.05.25	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Анастасія ТУЗЕНКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Вікторія КРАСІНЬКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## Зміст

РЕФЕРАТ .....	6
ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту .....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента .....	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища .....	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	22
2.4. Таксономічний статус біологічного агента .....	23
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування .....	25
3.1 Потреба у цільовому продукті .....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера.....	28
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу целюлази .....	29
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	31
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента .....	31
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	33
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми .....	36
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	36
5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.....	37
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	39
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів .....	39
5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва целюлази <i>Trichoderma harzianum</i> .....	46
5.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу целюлази <i>T. harzianum</i> .....	51
5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	51
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м <sup>3</sup> .....	52

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт і виробничого біосинтезу .....	53
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу целюлази .....	57
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту.....	63
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва .....	66
9.1 Мікробіологічний контроль .....	66
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	67
9.2.1 Визначення концентрації біомаси .....	67
9.2.2 Визначення ферментативної активності цільового продукту .....	67
9.2.3 Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену.....	68
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	69
ДОДАТКИ.....	80

## РЕФЕРАТ

В даній кваліфікаційній роботі було розроблено технологічну схему біосинтезу ферменту целюлази за допомогою гриба *Trichoderma harzianum*. *T. harzianum* є оптимальним продуцентом, оскільки культивує фермент целюлазу з високою ферментною активністю, та порівняно низькою вартістю поживного середовища.

Технологічна схема біосинтезу целюлази включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування розчину мікроелементів, приготування розчину для обробки рисової соломи, попередня обробка рисової соломи, підготовка і стерилізація поживного середовища) та технологічний процес (приготування посівного матеріалу та промисловий біосинтез целюлази). Технологія отримання целюлази передбачає використання твердофазового культивування. Основні етапи післяферментаційної обробки включають екстракцію та очищення. У роботі було проведено вибір засобів для миття і дезінфекції виробничого обладнання та поверхонь.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, де'яти розділів, списку використаних джерел, додатків, технологічної схеми (формат А2, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А2, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи – 91 сторінка, 12 таблиць, 4 рисунків.

**Ключові слова:** целюлаза, фермент, *Trichoderma harzianum*, біосинтез, твердофазове культивування

## ABSTRACT

A technological scheme for the biosynthesis of the cellulase enzyme using the fungus *Trichoderma harzianum* was developed in this qualifying work. *T. harzianum* is an optimal producer, as it synthesizes cellulase with high enzymatic activity and requires a relatively low-cost nutrient medium.

Technological scheme for the biosynthesis of the cellulase enzyme includes auxiliary stages (preparation of aeration air, preparation of the micronutrient solution, preparation of the solution for rice straw treatment, pre-treatment of rice straw, preparation and sterilization of the nutrient medium) and the technological process (preparation of the inoculum and industrial biosynthesis of cellulase). The cellulase production technology is based on solid-state fermentation. The main stages of post-fermentation processing include extraction and purification. The study involved the selection of cleaning and disinfection agents for production equipment and surfaces.

The qualification theses consists of an introduction, nine chapters, a list of references, appendices, a technological flow chart (A2 format, 1 sheet) and an equipment scheme (A2 format, 1 sheet). The total volume of the work is 91 pages, 12 tables, 4 figures.

Keywords: cellulase, enzyme, *Trichoderma harzianum*, biosynthesis, solid state fermentation

## ВСТУП

Біотехнології та фармацевтика є провідними сферами промисловості в більшості країн світу. Вони є рушійними силами в створенні сучасної економічної системи оскільки забезпечують нові робочі місця.[1] Тваринництво також відіграє важливу роль на світовому ринку. Воно включає виготовлення м'яса, яєць та молока, виробництво вовни та інших побічних продуктів. Оскільки така продукція є базовою для харчової промисловості, тваринництво залишається стабільно прибутковою галуззю з високими доходами. Саме тому використання цільового продукту в тваринництві є досить перспективним та несе за собою значні прибутки. [2]

Целюлази – це клас ферментів, які відіграють важливу роль у глобальному циклі вуглецю, розкладаючи нерозчинну целюлозу до розчинних цукрів. Фермент легко піддається біологічному розкладанню, має високу розчинність у воді, легко біотрансформується в організмах протеазами та пептидази та не адсорбується в ґрунті. [3] Фермент целюлаза не синтезується організмом людини та тварин. Проте вона є необхідною для кращого перетравлення рослинної їжі, оскільки має здатність перетравлювати клітковину та позитивно впливати на процеси травлення організму.

У фармацевтичній промисловості препарати на основі целюлази є досить поширеними. Целюлази використовують у складі деяких біодобавок для зменшення здуття та полегшення симптомів розладів травлення. Її популярність зростає через натуральне походження та високу ефективність.[4]

Завдяки здатності целюлаз перетворювати целюлозовмісні матеріали на цукри, протягом останніх десятиліть їх розглядають як перспективний інструмент для виробництва біопалива. Оскільки великі обсяги целюлазовмісних відходів накопичуються або використовуються неефективно (кукурудза, цукрова тростина, рис) їх правильне використання має важливе

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тузенко А.В.			ВСТУП	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					8	91
Реценз.						8		
Н. Контр. Н.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

значення для зниження витрат у виробничих процесах. Такий підхід сприяє розвитку сталих технологій та зменшенню шкідливого впливу на довкілля. [5]

У сільському господарстві целюлази також відіграють важливу роль. Найбільш поширене їх застосування у тваринництві, де їх додають до кормів для покращення засвоєння поживних речовин і підвищення ефективності годівлі тварин. Вони сприяють розщепленню клітковини у рослинних залишках, полегшуючи засвоєння поживних речовин в організмі тварин. Це особливо важливо при використанні грубих кормів, таких як сіно чи солома. [6]

Продуковану обраним біологічним агентом *Trichoderma harzianum* целюлазу буде використано для виготовлення кормових сумішей для великої рогатої худоби. Також особливістю даної роботи є синтез целюлаз твердофазовим культивуванням з використанням горизонтального ферментера.

## РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Целюлази – це клас ферментів, які відіграють важливу роль у глобальному циклі вуглецю, розкладаючи нерозчинну целюлозу до розчинних цукрів.[7]

### Хімічні властивості.

Хімічна назва: 1,4-(1,3;1,4)-β-D-глюкоан-4-глюканогідролаза.  
Молекулярна маса: 20 000 - 80 000 дальтон. За нормальних умов має вигляд білих кристаликів, або порошку. Фермент целюлаза легко піддається біологічному розкладанню, має високу розчинність у воді і легко біотрансформується в організмах протеазами та пептидази, не адсорбується в ґрунті. [8]

Розрізняють три типи целюлаз: [7]

1. Ендоглюканази (ЕС 3.2.1.4) – доволіно розщеплюють ланцюги целюлози зсередини.
2. Екзоглюканази або целобіогідролази (ЕС 3.2.1.91) – розщеплюють целюлозу, починаючи з вільного кінця ланцюга та виробляючи целобіозу. Є ключовими ензимами загального гідролізу целюлози.
3. Глюкозидази – гідролізують розчинні целодекстрини і целобіозу в глюкозу.

Повний розпад целюлози до глюкози вимагає синергічної дії всіх трьох типів целюлази. Ендоглюканази генерують нові відновлюючі та невідновлюючі кінці ланцюга целюлози; екзоглюканази вивільняють целобіозу з кінців, створених ендоглюканазами і глюкозидази гідролізують целобіозу до глюкози. [7]Целюлаза не синтезується організмом людини. Цей фермент здатний розщеплювати целюлозу, яка є необхідною для правильного функціонування кишкової флори. [9]

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Тузенко А.В.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту		
Перевір.		Красінько В.О.					
Реценз.							
Н. Контр. Н.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ..	Арк..	Аркушів
						10	9/10
					Кафедра БТМ		

Розрізняють два механізми дії целюлази:

1. гідроліз целюлози зі збереженням стереохімії аномерної гідроксильної групи
2. гідроліз целюлози з інверсією аномерної гідроксильної групи

Целюлаза каталізує розкладання полісахариду целюлози шляхом простого руйнування  $\beta$ -1,4-глікозидних зв'язків. Існує три основних етапи виробництва целюлази:

1. Попередня стадія ферментації (попередня обробка та середня підготовка субстрату)
2. Стадія ферментації (культивування організму)
3. Стадія після ферментації (подальша обробка та відновлення продукту)

### **Сфери застосування.**

Целюлазу використовують у ферментних препаратах, що використовуються для приготування розчинної кави, хліба, фруктових соків і вина, використовується як інертний інгредієнт у нехарчових продуктах.[10]

Здатність целюлази видаляти плями є основною метою використання її у виробництві миючих засобів.[11] Основними виробниками миючих засобів на основі целюлази є *Celluzyme* і *Carezyme*. Також використовують комбінації ензимів. Наприклад до складу миючого засобу SaniZyme від *SIRMAXO* (Індія) входить ліпаза, целюлаза, амілаза та протеаза. Використовується він для видалення з хірургічних інструментів різних забруднень, а саме крові, білка, жирів, ліпідів і вуглеводів.

Целюлоза успішно використовується в текстильній промисловості.[12] Фермент використовується покращення якості тканин, яскравості кольору, для вологої обробки текстилю та видалення забруднення з тканин. Також

целюлаза допомагає створити ефект старіння, тобто вицвілий колір, на джинсових тканинах. Целюлази є основним компонентом пральних порошків.

В біоенергетиці целюлази використовуються для отримання палива. Целюлазний комплекс ферментів використовують для гідролізу целюлози з рослинних матеріалів до цукрів, а потім ферментують отримані моносахариди до біоетанолу або інших видів палива. [12]

Окрім цього, целюлаза має позитивний ефект на процеси травлення організму людини, оскільки допомагає перетравлювати клітковину. [13] Тому целюлазу використовують для виготовлення засобів від порушення травлення. Наприклад препарат «Дигестин» від виробника *PHARCO* (Єгипет), у складі якого є целюлаза, допомагає розщеплювати целюлозу до легкозасвоюваної форми.[14]

Препарат «*Дігест 365*» рекомендований у випадках зниженої екзокринної функції підшлункової залози, зокрема при хронічному панкреатиті та інших порушеннях процесів травлення, є додатковим джерелом ферментів. До складу засобу входять амілаза, протеаза, лактаза, ліпаза та целюлаза, які сприяють розщепленню білків, жирів та вуглеводів, покращуючи тим самим засвоєння поживних речовин у тонкому кишечнику. Целюлаза, зокрема, забезпечує розщеплення целюлози до оліго- та моносахаридів, що сприяє кращому засвоєнню рослинної клітковини. [15]

Також целюлази широко використовуються в тваринницькій галузі. Велика рогата худоба та птиця споживає велику кількість рослинної їжі, а целюлаза в харчових добавках сприяє покращенню засвоєвання їжі, розщеплюючи целюлозу до простіших цукрів. Прикладом такої суміші є «Ветозим Тріо» від виробника *Ветсинтез* (Україна) до складу якої входять ферменти целюлаза, ксиланаза, фітаза. Дана суміш допомагає знизити в'язкість та час проходження по травному каналу некрохмальних

полісахаридів, оскільки гідролізує їх та покращує поживну цінність зернових у кормах. [16]

До складу препарату входить ферментний комплекс, який забезпечує розщеплення вуглеводів та гідроліз некрохмальних полісахаридів, сприяючи підвищенню поживної цінності кормів і кращому засвоєнню поживних речовин. Целюлаза, як один із компонентів, ефективність використання кормів, поживну цінність раціону, що як наслідок позитивно впливає на міцність кісток, сприяє приросту маси тіла. 1 г кормової суміші містить наступні діючі речовини:

- пропіленгліколь – 10%;
- гліцерин – 5%;
- ксиланаза – не менше 7 430 ОД;
- фітаза – не менше 6 620 ОД;
- целюлаза – не менше 930 ОД. [16]

Кормова суміш випускається у формі пакетів по 1 кг та крафт-мішків по 10 і 25 кг. Застосовують препарат перорально, додаючи його безпосередньо до корму. Для великої рогатої худоби та свиней рекомендована доза становить 100-200 г на 1 тонну корму. Термін придатності препарату складає 12 місяців. Зберігати його слід у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 0 до 25°C і відносній вологості повітря не вище 80%. [16]

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента

### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Згідно літературних даних [17] клітинні та позаклітинні целюлази продукуються різними мікроорганізмами, включаючи актиноміцети, аеробні/анаеробні бактерії та гриби (табл 2.1).

Таблиця 2.1

#### Найбільш відомі продуценти целюлаз

Гриби	Аеробні бактерії	Анаеробні бактерії	Актиноміцети
<i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. heteromorphus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>Bulgaria sp.</i> ; <i>Chaetomium spp.</i> ; <i>Fusarium sp.</i> ; <i>Geotrichum sp.</i> ; <i>Helotium sp.</i> ; <i>Myrothecium sp.</i> ; <i>Penicillium waksmanii</i> ; <i>Phanerochaete sp.</i> ; <i>Schizophyllum sp.</i> ; <i>Serpula sp.</i> ; <i>Trichoderma aureoviride</i> ,	<i>Acetobacter oboediens</i> , <i>A. pasteurianus</i> ; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ; <i>Acinetobacter amitratus</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>B. cereus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>Bacteroides sp.</i> ; <i>Botrytis sp.</i> ; <i>Cellulomonas bioazotea</i> , <i>C. cellulans</i> , <i>C. fimi</i> , <i>C. flavigena</i> , <i>C. uda</i> ; <i>Cellvibrio gilvus</i> ; <i>Citrobacter freundii</i> ; <i>Cytophaga hutchinsonii</i> ; <i>Enterobacter sp.</i> ; <i>Erwinia sp.</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Eubacterium cellulosolvens</i> ; <i>Geobacillus pallidus</i> , <i>G. stearothermophilus</i> , <i>H. muralis</i> ; <i>Klebsiella pneumonia</i> ; <i>Paenibacillus curdolanolyticus</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Clostridium acetobutylium</i> , <i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus albus</i>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> , <i>S. lividans</i> ; <i>Thermomonospora curvata</i> , <i>T. fusca</i>

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ..	Арк..	Аркушіє
Розроб.		Тузенко А.В.					8	91
Перевір.		Красінько В.О.						14
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Стратегія гідролізу целюлози (характерного субстрату) відрізняється у анаеробних та аеробних бактерій. Анаеробні бактерії розкладають целюлозу за допомогою комплексної внутрішньої целюлазної системи ферментів (так званої целюсоми), в той час як аеробні бактерії – шляхом дії позаклітинних вільних целюлаз, що можна виділити із супернатанту [18].

Найбільшу активність ферменту зафіксовано для *Trichoderma longibrachiatum* LMLSAUL 14-1 (75,04 МО/г) протягом 168 год. Найнижча активність ферменту (0,25 МО/г) спостерігалася за культивування *Aspergillus* sp. IN5 протягом 120 год. *Trichoderma harzianum* за 48 годин культивування продукує фермент з активністю 2,38 FPU/gds.

Таблиця 2.2

## Особливості одержання целюлази різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Активність целюлази, МО/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> LMLSAUL 14-1	Fresh banana pseudostems (BPSs) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> дріжджовий ек-т	3,00 2,00 0,50 0,01 0,15 7,00 1,00 1,20	168	75,04 (FPU/g) СМCase (ендоглюкана за, 111,35 ОД/г за 192 год) і β-глюкозидаза (235,83 ОД/г, 192 год)	t° = 30 C, pH – 6,5 , вологість – 75%	Legodi, L. M., La Grange, D. C., & van Rensburg, E. L. J. (2023). Production of the Cellulase Enzyme System by Locally Isolated Trichoderma and Aspergillus Species Cultivated on Banana Pseudostem during Solid-State Fermentation. Fermentation, 9(5), 412. <a href="https://doi.org/10.3390/fermentation9050412">https://doi.org/10.3390/fermentation9050412</a>
<i>Aspergillus sp.</i> IN5	Соєва макуха FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O дріжджовий ек-т пептон (polypeptone) КМЦ агар	5,00 2,00 4,00 2,00 1,00 1,00 5,00 10,00 15,00	120	0,25 (FPU/g) СМCase (ендоглюкана за) 2,91 ± 0,03 ОД/г субстрату) і β-глюкозидази (183,43 ± 1,99 ОД/г субстрату)	t° = 35 C, pH – 7, вологість – 70%	Boondaeng, Antika & Keabpimai, Jureeporn & Trakunjae, Chanaporn & Vaithanomsat, Pilanee & Srichola, Preeyanuch & Niyomvong, Nanthavut. (2024). Cellulase production under solid-state fermentation by Aspergillus sp. IN5: Parameter optimization and application. Heliyon. 10. e26601. 10.1016/j.heliyon.2024.e26601.

Закінчення таблиці 2.2

<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	целобіоза NH <sub>4</sub> Cl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O дріжджовий ек-т	5,00 1,00 1,00 0,10 0,10 0,20 1,00	144	CMCase Ендоглюкан аза 1,2 (ОД/г )	pH – 5,2, t° = 55 C, частота обертів 150 об/хв	Rezaei F., Joh L. D., Kashima H., Reddy A. P, VanderGheynst J. S. Xylanase and cellulase production by <i>Acidothermus cellulolyticus</i> grown on switchgrass in solid-state fermentation. <i>Biofuels</i> . 2015, 2(1): 21-32. doi: <a href="https://doi.org/10.4155/bfs.10.82">10.4155/bfs.10.82</a>
<i>Trichoderma harzianum</i>	рисова солома пептон	5,00 5,00	48	CMCase Ендоглюкан аза 16,13 (ОД/г)	pH – 4.8, t° = 30 C	Syuan, K.Y., Ai, L.O., & Suan, T.K. (2018). Evaluation of cellulase and xylanase production from <i>Trichoderma harzianum</i> using acid-treated rice straw as solid substrate.
Спільна культура <i>Trichoderma reesei</i> NCIM 1186 і <i>Penicillium citrinum</i> NCIM 768	пшеничні висівки пептон дріжджовий ек-т KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O сечовина MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O полісорбат 80	5,00 0,25 0,10 2,00 0,30 0,30 0,30 1,40 0,005 0,0016 0,0014 0,002 0,10	144	2,38 FPU/gds	pH – 5, t° = 30 C, вологість – 70%	Lodha, Ankit & Pawar, Shweta & Rathod, Virendra. (2020). Optimised Cellulase production from Fungal Co-Culture of <i>Trichoderma reesei</i> NCIM 1186 and <i>Penicillium citrinum</i> NCIM 768 under Solid State fermentation. <i>Journal of Environmental Chemical Engineering</i> .

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів  
целюлази**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>LMLSAUL 14-1</i>	Fresh banana pseudostems	3,00	1 700	5,1	14
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00	252	0,504	2
	KCl	0,50	480	0,24	3
	FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,01	41	0,00041	1
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,15	120	0,018	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,00	124	0,018	9
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	75	0,01	10
	Дріжджов. ек-т	1,20	5 942	7,1304	5
<b>Вартість 1 л середовища – 13,87 грн</b>					
<i>Aspergillus sp.</i> <i>IN5</i>	Соева макуха	5,00	37	0,185	13
	FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,00	41	0,082	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,00	252	1,008	2
	KCl	2,00	480	0,96	3
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00	120	0,12	4
	Дріжджовий ек-т	1,00	5 942	5,942	5
	пептон	5,00	1 300	6,5	6
	КМЦ	10,00	237,37	2,3737	7
	Агар	15,00	744	11,16	8
<b>Вартість 1 л середовища – 28,3 грн</b>					
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	целобіоза	5,00	420	2,8	16
	NH <sub>4</sub> Cl	1,00	60	0,06	11
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00	124	0,124	9
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,10	80	0,008	15
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,10	120	0,012	4
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,20	60	0,012	12
	Дріжджов. ек-т	1,00	5 942	5,942	5
<b>Вартість 1 л середовища – 8,96 грн</b>					
<i>Trichoderma harzianum</i>	Рисова солома	5,00	1,78	0,0089	17
	Пептон	5,00	1 300	6,5	6
	<b>Вартість 1 л середовища – 6,509 грн</b>				
Спільна культура <i>Trichoderma reesei</i> NCIM 1186 i	Пшеничні висівки	5,00	640	3,2	23
	Пептон	0,25	1 300	0,325	6
	Дріжджовий ек-т	0,10	5 942	0,5942	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	124	0,248	9
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,30	60	0,018	12
	Сечовина	0,30	396	0,1188	23

<i>Penicillium citrinum</i> NCIM 768	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,30	120	0,036	4
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,40	75	0,105	10
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005	800,4	0,004002	18
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0016	99	0,000158	19
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0014	49,50	6,93E-05	20
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,002	1 950	0,0039	21
	Полісорбат 80	0,10	310	0,031	22
<b>Вартість 1 л середовища – 4,68 грн</b>					

- <https://ophim.com.ua/uk/produksiia/monohidrat-sulfatu-zaliza>
- <https://shop.hlr.ua/ua/kaliy-fosfornokislyy-2-zameshchenny-ch-263420.html>
- <https://shop.hlr.ua/ua/kaliy-hloristy-y-hch-97816.html>
- [https://prom.ua/ua/p1091469729-magnij-sernokislyj-vodnyj.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1\\_5297199152&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAmfq6BhAsEiwAX1jsZ93M-8nyb2VJ8IUhuog-d\\_AlgIU-jYKniY9No5oD2C7UYvyOOYSJrRoCBvQQA\\_vD\\_BwE](https://prom.ua/ua/p1091469729-magnij-sernokislyj-vodnyj.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAmfq6BhAsEiwAX1jsZ93M-8nyb2VJ8IUhuog-d_AlgIU-jYKniY9No5oD2C7UYvyOOYSJrRoCBvQQA_vD_BwE)
- <https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html>
- <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>
- <https://ukrhim.com.ua/ua/p415942760-karboksimetiltseilyuloza-tsellyulozogliolevaya.html?srsid=AfmBOoqRXZWILxEFlo-Ei7VINPYE8QbZa8rbPpOl2HBabeJgUylrwi2x>
- <https://ukrhim.com.ua/ua/p415306250-agar-agar-agar.html>
- <https://klebrig.com.ua/ua/p2238323337-monokalij-fosfat-500.html>
- <https://mychem.in.ua/ua/p1902927947-sulfat-ammoniya-basf.html?srsid=AfmBOoonCrICB-eQEZHUYmx3-ukCWzq74dh4YX3BtzMEFIKCNRQrF0ut>
- [https://imetalua.com/ammonium\\_chloride/](https://imetalua.com/ammonium_chloride/)
- <https://shop.hlr.ua/ua/kalcij-hloristy-y-2h-vodnyy-cheshuya-pishchevoy-263382.html>
- <https://rozetka.com.ua/ua/435825122/p435825122/>
- <https://ishalife.com.ua/orhanichnyj-poroshok-vazhai-thandu-steblo-banana-pry-kamieniakh-u-nyrkakh-ta-ozhyrinni-100-hr/>
- <https://rubber-chemicals.en.made-in-china.com/product/efjYzwOUERVk/China-Disodium-Phosphate-Powder-Na2hpo4-7H2O-CAS7558-79-4.html>
- [https://getchem.en.made-in-china.com/product/gEFRYCelHArS/China-Manufactory-Supply-High-Quality-D-Cellobiose-CAS-528-50-7.html?pv\\_id=1ihg1j1o54a4&faw\\_id=1ihg1kkos44](https://getchem.en.made-in-china.com/product/gEFRYCelHArS/China-Manufactory-Supply-High-Quality-D-Cellobiose-CAS-528-50-7.html?pv_id=1ihg1j1o54a4&faw_id=1ihg1kkos44)
- <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/prodam-risovu-solomu-v-rulonovih-tyukah-400-500kg-IDVTB11.html>
- <https://shop.hlr.ua/ua/jelezo-ii-sernokisloe-hch-97771.html>
- <https://shop.hlr.ua/ua/marganec-sernokislyy-ch-243030.html>
- [https://www.systopt.com.ua/item-tsynk-sirchanokyslyj-sulfat-tsynku?srsid=AfmBOooOS45b4YywYEsmsGFgdBNwveRxr8uSDqra5quxq\\_IMjoM43nt1](https://www.systopt.com.ua/item-tsynk-sirchanokyslyj-sulfat-tsynku?srsid=AfmBOooOS45b4YywYEsmsGFgdBNwveRxr8uSDqra5quxq_IMjoM43nt1)
- <https://www.systopt.com.ua/item-kobalt-hlorystyj-hloryd-kobaltu-6-vodnyj?srsid=AfmBOope4UsouJfKyykmISGBZzXTaLL5JZ3FP-1kEztBKK5zNC9xqgfz>
- [https://beurre.ua/ua/emulgator-polysorbat-80-twin-80-100-g?srsid=AfmBOori2br\\_ax5eyGomQ0wYdsjrXLUTRFEArxzWSqDP2clGY4Yk7ss](https://beurre.ua/ua/emulgator-polysorbat-80-twin-80-100-g?srsid=AfmBOori2br_ax5eyGomQ0wYdsjrXLUTRFEArxzWSqDP2clGY4Yk7ss)
- <https://shop.hlr.ua/ua/mochevina-ch-242837.html>
- <https://xn--h1adbgjmk.com.ua/ua/p598918376-visivi-pshenichni.html?srsid=AfmBOoo9fTVSVyp4z1vfC9uLZezRjCcUOmouH1DvlePAeLSgveF6M11b>

Далі необхідно розрахувати вартість поживних середовищ для обраних мікроорганізмів-продуцентів целюлази (табл.2.3).

Відповідно до розрахунків, проведених у таблиці 2.3, можна зробити висновок, що поживне середовище для культивування спільної культури *Trichoderma reesei NCIM 1186* і *Penicillium citrinum NCIM 768* є найбільш дешевим (4,68 грн/л). Також відносно низьку вартість має поживне середовище для *Trichoderma harzianum* (6,509 грн/л). Найдорожчою (28,3 грн/л) виявилась вартість поживного середовища для культивування *Aspergillus sp. IN5*. Вартість субстрату для *Trichoderma longibrachiatum LMLSAUL 14-1* та *Acidothermus cellulolyticus* складає 13,87 та 8,96 грн/л відповідно.

Щоб обрати найефективнішого продуцента целюлази було проведено розрахунки умовної вартості 1 МО цільового продукту (табл. 2.4). За результатами розрахунків можна зробити висновок, що фермент з найбільшою целюлазною активністю продукують одразу два біологічних агенти, а саме *Trichoderma longibrachiatum LMLSAUL 14-1* (0,347 МО/год) та *Trichoderma harzianum* (0,336 МО/год) із невеликою різницею в показниках. Найменшу ферментну активність має целюлаза, синтезована *Aspergillus sp. IN5* (0,0021 МО/год). Також необхідно врахувати умовну вартість 1 МО цільового продукту). Найнижчою є вартість продукту у *Trichoderma longibrachiatum LMLSAUL 14-1* (0,185 грн/МО), а найбільшою – у *Aspergillus sp. IN5* (28,3 грн/МО). Також варто звернути увагу на вартість продукту, синтезовану *Trichoderma harzianum* (0,403 грн/МО), оскільки вона теж є досить низькою.

Враховуючи проведені вище розрахунки, а тож інформацію про процеси синтезу ферменту різними біологічними агентами можна зробити висновок, що *Trichoderma longibrachiatum LMLSAUL 14-1* продукує фермент з найвищою активністю ферментів целюлолітичного комплексу (0,347 МО/год), а також має найдешевшу умовну вартість поживного середовища (0,185 грн/МО). Проте використання цього мікроорганізму в даній роботі буде не доцільним, оскільки в складі поживного середовища є відходи вирощування

бананів, сировинна база яких в Україні є відсутньою. Тому більш доцільно буде обрати *Trichoderma harzianum*, який також продукує фермент із високою целюлазною активністю (0,336 МО/год), має недовгу тривалість культивування (48 год) та низьку умовну вартість поживного середовища (0,403 грн/МО).

Таблиця 2.4

**Умовна вартість 1 міжнародної одиниці активності целюлази, синтезованої на різних поживних середовищах**

Біологічний агент	Активність целюлази, МО/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної целюлази за годину, МО/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 МО цільового продукту, грн/МО
1	2	3	4	5	6
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> LMLSAUL 14-1	75,04	168	0,347	13,87	0,185
<i>Aspergillus sp. IN5</i>	0,25	120	0,0021	28,3	113,2
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	1,2	144	0,0083	8,96	7,465
<i>Trichoderma harzianum</i>	16,13	48	0,336	6,509	0,403
<i>Trichoderma reesei</i> NCIM 1186 і <i>Penicillium citrinum</i> NCIM 768	2,38	144	0,016	4,68	1,96

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Для виробничого біосинтезу целюлази необхідне поживне середовище наступного складу (г/л) [19]: рисова солома та зволожуючий розчин у співвідношенні 1 до 1. Зволожуючий розчин складається з води та пептону. Концентрація пептону у зволожуючому розчині становить 1%.

Для підготовки посівного матеріалу використовується середовище наступного складу: [20]

Авіцел – 5 г/л,

Натрієва сіль КМЦ – 5 г/л,

Сечовина – 0,3 г/л,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1.4 г/л,

$\text{CaCl}_2$  – 0,3 г/л,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2 г/л.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 5,0 мг/л,

$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,5 мг/л,

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,4 мг/л,

$\text{CoCl}_2$  – 2,0 мг/л.

Відповідно до проведених розрахунків у розділі 1, виробничий біосинтез ферменту целюлази буде відбуватися у ферментері 1 м<sup>3</sup>, в якому знаходиться 564,7 л поживного середовища. Підготовка посівного матеріалу відбувається в 1 етап та проходить у колбах на качалці.

### **2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**

Гриби роду *Trichoderma* є аеробними організмами, а також не проявляють активного росту на високих температурах і найкраще ростуть за температурного діапазону 25-30 °С. Серед поживних середовищ, сприятливих для росту гриба є картопляно-декстрозний агар (PDA) (колонії білого кольору) та декстрозний агар з кукурудзяного борошна (колонії прозорі). [21] Під час культивування на PDA спостерігається швидкий ріст *T. harzianum* з утворенням міцелію білого кольору, які розростаються по всій поверхні чашки

за 3-4 дні. Також під час росту помітні структури зеленого кольору, які змінюють своє забарвлення після 4 дня культивування, коли починається утворення спор. *T. harzianum* здатний змінювати жовтий колір агару PDA на помаранчевий. [19]

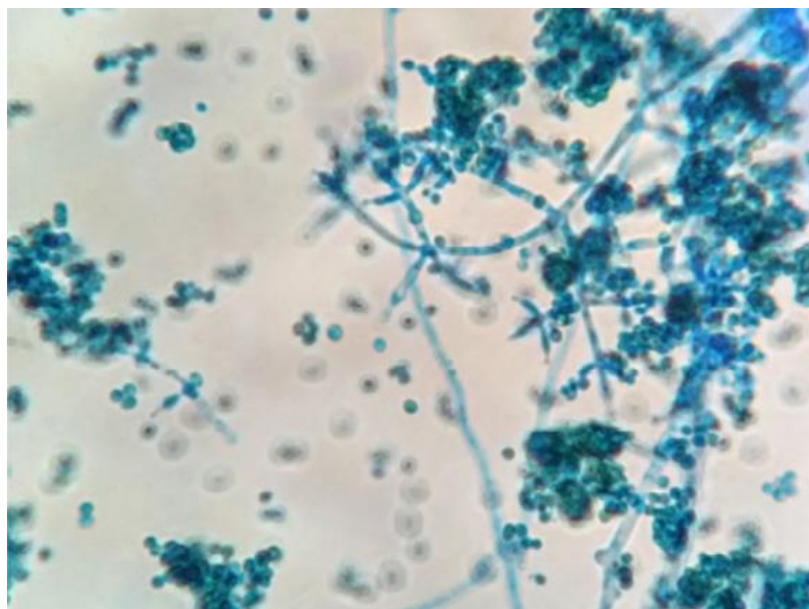


Рис.2.1 Світлова мікроскопія клітин *T. harzianum* [19]

Під час мікроскопіювання видно, що кондії *T. harzianum* мають субкулясту форму та прикріплені до розгалуженого кондієносця. В свою чергу, кондієносець спочатку трохи загинається до верхівки, а потім зростає ближче до основи. [19]

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Філогенетичну класифікацію для *T. harzianum* наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [22].

Домен – *Eukaryota*

Царство – *Fungi*

Тип – *Ascomycota*

Клас – *Sordariomycetes*

Порядок – *Hypocreales*

Родина – *Hypocreaceae*

Рід – *Trichoderma*

Вид – *Harzianum*

## РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

### 3.1 Потреба у цільовому продукті

Тваринницька галузь в Україні невпинно зростає та приносить значні прибутки. Особливо перспективним є напрямок молочного тваринництва, оскільки рентабельність даних підприємств сягає 36%.[23] Найбільші витрати в даній галузі складають корми тому дуже важливо правильно підібрати продукти для тварин. Корів годують сіном, соломою, силосом, а також різними овочами, а саме буряками та морквою.[24] Наслідком споживання такої кількості рослинної їжі є розвиток проблем травлення у тварин, а також багато харчових продуктів мають в своєму складі недостатню кількість білку та забагато клітковини. Тому необхідно збагачувати корми ферментними харчовими сумішами, особливо сумішами з целюлазами. Даний фермент здатний покращити засвоєння їжі тваринами завдяки здатності целюлази розщеплювати целюлозу до простіших розчинних цукрів. Численні дослідження лише підтверджують позитивний ефект використання целюлази в раціоні ВРХ (великої рогатої худоби), а також було зафіксоване збільшення вироблення молока на 5-25%.[25]

За даними статистики Асоціації виробників молока поголів'я ВРХ в Україні складає 2,41 млн голів, з них 1,32 млн – корів. Майже 29% корів утримується на підприємствах, а інші 71% - у господарських населеннях. Провідними областями за кількістю ВРХ є Хмельницька (232 тис. голів), Полтавська (193 тис. голів) Вінницька (183 тис. голів) та Львівська області (126 000).[26]

Очікувано, що після початку повномасштабної війни багато підприємств зазнали труднощів та збитків, а також значно знизилась як кількість ВРХ, так і продуктивність фермерських господарств. Проте станом

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Лім..	Арк..	Аркушіє
Розроб.		Тузенко А.В.					23	91
Перевір.		Красінько В.О.						25
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

на кінець березня 2022 року вже 65% підприємств повністю відновили свою роботу, а статистика за січень 2024 року повідомляє що поголів'я ВРХ хоч і скоротилося на 73,5 тисячі, проте це на 3,3% менше ніж попереднього року.[27] Також зростає чисельність великої рогатої худоби на прифронтових регіонах, наприклад в Донецькій (на 12,8%), Харківській (на 15,5%) та Херсонській (на 6,1%) областях. Отже, молочне тваринництво залишається стійким до впливу негативних зовнішніх факторів.[26]

Прикладом препарату який має в своєму складі целюлазу є «Ветозим тріо» – це кормова суміш призначена для покращення перетравлення та засвоєння поживних речовин для ВРХ, а також свиней та птиці. [28] Випускається у формі порошку та призначена для застосування разом з кормом. В складі суміші знаходиться щонайменше 930 МО целюлази на грам.

Кількість корму, що має спожити корова на день складає 3-3,5% від загальної маси тварини. Середня вага корів складає 550кг, отже необхідно близько 16,5 кг корму на день[29]. Розрахуємо кількість корму на день, яку споживають корови в Львівській області:

$$126\ 000 * 16,5\ \text{кг} = 2\ 016\ 000\ \text{кг} (2\ 016\ \text{т})$$

Тоді річна потреба корму складає:

$$2\ 016\ \text{т} * 365 = 735\ 840\ \text{т корму}$$

Кормову суміш необхідно вводити в раціон у співвідношенні 100-200г на 1 тону корму. Візьмемо значення 100 г та розрахуємо річну потребу в суміші:

$$735\ 840\ \text{т} * 100\ \text{г} = 73\ 584\ 000\ \text{г}$$

Знаючи, що в 1 г суміші міститься 930 МО целюлази, можемо розрахувати, що

$73\ 584\ 000 * 930\ \text{МО} = 68\ 433 * 10^6\ \text{МО}$  річна потреба ферменту для області

## Вихідні дані для розрахунку річної потреби у ферменті целюлази мікробної культури *T. harzianum*

Тип ВРХ	Поголів'я в області	Кількість корму на рік, т	Кількість кормової суміші на рік, г	Річна потреба ферменту, МО
Корови	126 000	735 840	$73 \cdot 10^6$	$68\,433 \cdot 10^6$

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

В Україні є декілька підприємств, що виробляють схожий препарат. Наприклад ТОВ «Ветсинтез» пропонує цілу лінію препаратів «Ветозим», які мають в своєму складі целюлазу, такі як «Ветозим Мульти», «Ветозим Квадро», «Ветозим Тріо» та «Ветозим Про». [30]

Безпосередньо целюлазу виробляють в Україні, наприклад компанія ENZIM Biotech [31], а також експортують з Китаю.[32] Враховуючи це, буде доцільним покрити 1% потреби Львівської області в целюлазі. Тобто необхідно виробити:

$$G_{\text{гп}} = 68\,433 \cdot 10^6 \text{ МО} \cdot 1\% = 684\,331\,200 \text{ МО целюлази}$$

Також необхідно врахувати загальні втрати при очистці ферменту, які складають 40%. Тоді потреба ферменту складатиме

$$\frac{684\,331\,200 \cdot 140\%}{100\%} = 957 \cdot 10^6 \text{ МО}$$

Відомо, що при культивуванні *T. harzianum* можна отримати целюлазу з ферментною активністю 16,13 МО/г (16 130 МО/кг). Розрахуємо загальну кількість маси субстратного міцелію, яка необхідна для біосинтезу ферменту целюлази:

$$16\,130 \text{ МО} = 1 \text{ кг}$$

$$957 \cdot 10^6 \text{ МО} = X \text{ кг}$$

$$X = \frac{957 * 10^6}{16\ 130} = 59\ 367,6 \text{ кг}$$

### 3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Щоб забезпечити розраховану потребу у даному ферменті необхідно отримати 59 367,6 кг субстрату. Для зручності проведення розрахунків буде доцільно перевести масу міцелію в об'ємні одиниці:

$$1 \text{ кг} = 0,9 \text{ л, тоді}$$

$$59\ 367,6 \text{ кг} = x \text{ л}$$

$$\frac{59\ 367,6}{0,9} = 65\ 964 \text{ л}$$

Дану кількість потрібно отримати за 300 робочих днів. Тоді об'єм субстрату за добу становить:

$$V_d = \frac{V_{\text{гп}}}{T_{\text{тр}}} = \frac{65\ 964}{300} = 220 \text{ л}$$

Коефіцієнт запасу складає 1,1, а цикл роботи ферментера, включно з тривалістю виробничого біосинтезу – 56 години (48 години виробничого біосинтезу + 8 годин підготовки). Тоді розрахуємо кількість субстрату за цикл:

$$V_{\text{цк}} = \frac{(K_1 * V_d * T_{\text{цф}})}{24} = \frac{1,1 * 220 * 56}{24} = 564,7 \text{ л/цикл}$$

Щоб визначити геометричний об'єм ферментера за один цикл, необхідно використати дані про об'єм за один цикл та коефіцієнт заповнення (0,7):

$$V_{\text{Г}} = \frac{V_{\text{цк}}}{K_3} = \frac{564,7}{0,7} = 806,7 \text{ л}$$

Найближчим за геометричним об'ємом є ферментер  $V_{\text{ф}} = 1 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = \frac{806,7}{1000} = 0,81$$

Даний коефіцієнт знаходиться в допустимих межах для твердофазового культивування в PDR біореакторі.

### **3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу целюлази**

Отже, геометричний об'єм ферментера складає 1 м<sup>3</sup>. Знаючи, що необхідна кількість субстрату для твердофазного культивування за цикл складає 564,7 л (див. п.1.3), можемо розрахувати необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу.

Користуючись літературними даними, дізнаємось що за твердофазного культивування на 1 кг сухого субстрату вносять 1 мл спорової культури з титром спор 1\*10<sup>7</sup> [33]. При розрахунку враховуємо, що 1 кг субстрату дорівнює об'єму 0,9 л.

0,9 л (1кг) = 1 мл спорової культури з титром спор 1·10<sup>7</sup>

564,7 л = x мл спорової культури

$$x = \frac{564,7}{0,9} = 627,4 \approx 700 \text{ мл спорової культури}$$

Такий об'єм засівної спорової культури можна отримати при культивуванні у колбах на качалках.

Для отримання даного об'єму спор можна використати колби Ерленмеєра. В одну колбу об'ємом 750 мл можна помістити 150 мл спорової культури. Коефіцієнт заповнення колб складає 0,2.

Необхідна кількість колб складе:

$$\frac{700}{150} = 4,67$$

Округлюємо до цілого числа, і отримуємо значення 5 колб. Тобто, для отримання посівної культури необхідно 5 колб Ерленмеєра.

Отже, процес отримання посівного матеріалу буде проходити в один етап у п'ятьох колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл. Виробничий синтез целюлази буде проходити в RDB біореакторі об'ємом 1 м<sup>3</sup>.

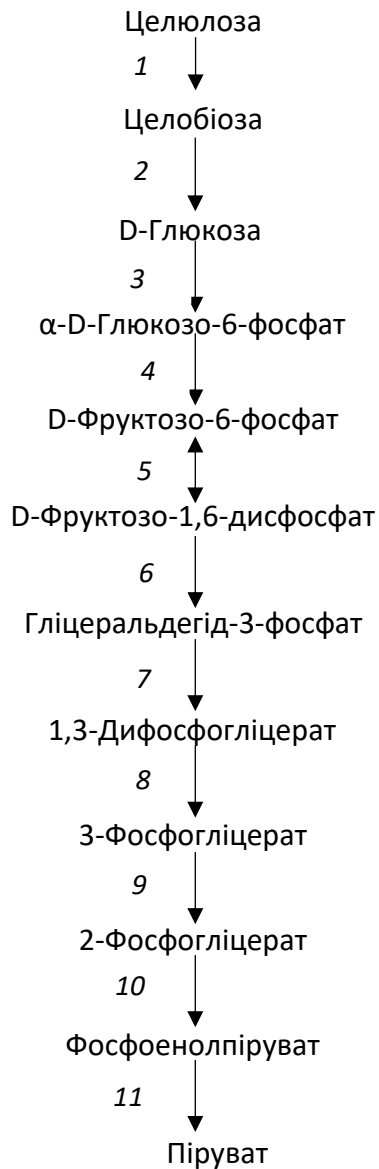
## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні на поживному середовищі *T. harzianum* – продуцента целюлази – є целюлоза, яка входить до складу рисової соломи. Для катаболізму ростового субстрату використовують гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Оскільки інформація про *T. Harzianum* відсутня, було обрано споріднений мікроорганізм *Trichoderma asperellum*.

Спочатку целюлозу необхідно розкласти до глюкози. Під дією целюлозної 1,4-бета-целобіозидази (КФ. 3.2.1.91) целюлоза розкладається до целобіози, яка в свою чергу перетворюється на глюкозу завдяки дії  $\beta$ -глюкозидази (КФ. 3.2.1.21).[34] Потім глюкокіназа (КФ. 2.7.1.2) діє на глюкозу та перетворює її на  $\alpha$ -D-Глюкозо-6-фосфат. Глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ. 5.3.1.9) зумовлює перетворення  $\alpha$ -D-Глюкозо-6-фосфату на D-Фруктозо-6-фосфат, який в свою чергу переходить до D-Фруктозо-1,6-дисфосфат під дією фруктозодифосфатальдолази (КФ. 4.1.2.13). Дія гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) спричиняє перехід від D-Фруктозо-1,6-дисфосфату до 1,3-дифосфогліцерату. 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ. 2.7.2.3) перетворюється на 3- фосфогліцерат, який в свою чергу за 2,3-біфосфатзалежної фосфогліцератмутази (КФ.5.4.2.11) перетворюється на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Останньою стадією є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40). [35]

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тузенко А.В.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					31	91
Реценз.								31
Н. Контр. Н.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						



*Рис 4.1.* Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – целюлозна 1,4-бета-целобіозидаза (КФ. 3.2.1.91); 2 – β-глюкозидаза (КФ. 3.2.1.21); 3 – гексокіназа (КФ. 2.7.1.1); 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ. 5.3.1.9); 5 – 6-фосфоглюкокіназа 1 (КФ. 2.7.1.11); 6 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 9 – 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40).

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

В результаті катаболізму *T. Asperellum* з целюлози, яка є джерелом вуглецю в даному поживному середовищі, утворюється піруват, який під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) перетворюється на ацетил-КоА, який потім входить до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Целюлаза – це клас ферментів, для синтезу якого необхідні серин, гліцин, глутамін, аспаргін та треонін. Одним з продуктів ЦТК є оксалоацетат, який при дії аспаргінсинтетази (КФ 6.3.5.4) перетворюється на **аспаргін**. [36] Також оксалоацетат необхідний для утворення треоніну, цей механізм наведений далі. Під впливом аспартаткінази (КФ 2.7.2.4) оксалоацетат перетворюється на аспартил-4-фосфат, який в свою чергу під дією аспартатнапівальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.11) перетворюється на напівальдегід аспаргінової кислоти. Дана кислота трансформується в гомосерин за участю фермента гомосериндегідрогенази (КФ 1.1.1.3), і далі гомосерин утворює фосфо-L-гомосерин за допомогою гомосеринкінази (КФ 2.7.1.39). Завершальним етапом є утворення **треоніну** з фосфо-L-гомосерину під дією L-треонінсинтази (КФ 4.2.3.1). [37]

Також під час ЦТК утворюється 2-оксоглутарат, який при дії глутаматсинтази (НАДН) (КФ 1.4.1.14) утворює глутамат, який під впливом L-глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) перетворюється на **глутамін**. [36]

Під час катаболізму глюкози відбувається перетворення 3-фосфогліцерату на 3-фосфогідроксипіруват під дією D-3-фосфогліцератдегідрогенази (КФ 1.1.1.95). 3-фосфогідроксипіруват каталізується апоферментом фосфосеринамінотрансфераза з утворенням фосфосерину. Зрештою фосфосерин піддається дії фосфосеринфосфатази (КФ 3.1.3.3) з утворенням **серину**, а серин в подальшому перетворюється на **гліцин** під дією серингідроксиметилтрансферази (КФ 2.1.2.1).[37]

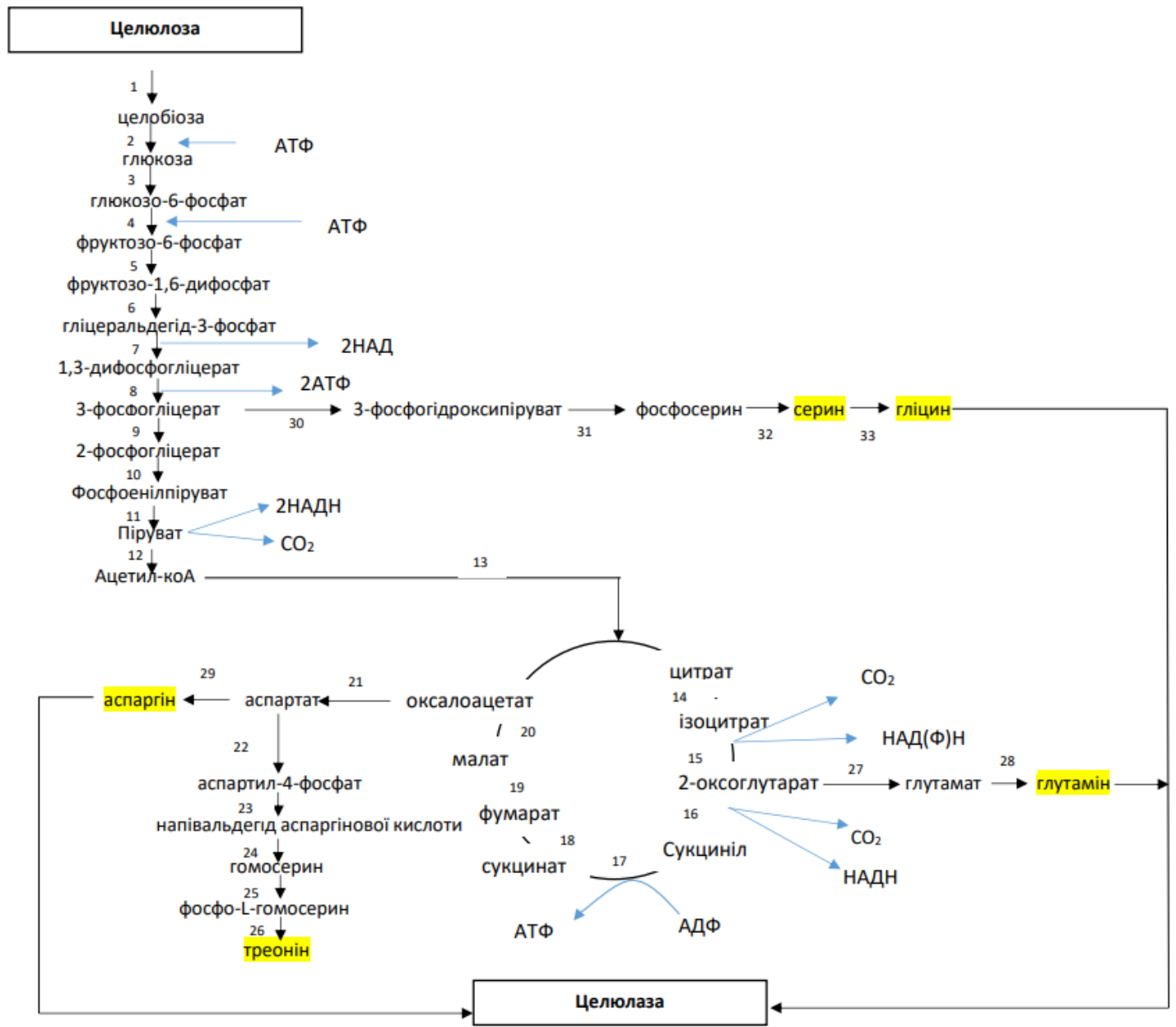


Рис. 4.2. Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт (целюлаза)

Ферменти: 1 – целюлозна 1,4-бета-целобіозадаза (КФ. 3.2.1.91); 2 –  $\beta$ -глюкозидаза (КФ. 3.2.1.21); 3 – гексокіназа (КФ. 2.7.1.1); 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ. 5.3.1.9); 5 – 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ. 2.7.1.11); 6 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 9 – 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40), 12 – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 13 – цитратсинтетаза (КФ 2.3.3.1); 14 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 15 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 16 – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 17 – сукциніл-КоА синтетаза альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5), 18 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 19 – фумараза (КФ 4.2.1.2); 20 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 21 - апофермент L-аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 22 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); 23 – аспартатнапівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 24 – гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3), 25 – гомосеринкіназа (КФ 2.7.1.39); 26 – L-треонінсинтаза (КФ 4.2.3.1); 27 – глутаматсинтаза (НАДН) (КФ 1.4.1.14), 28 – L-глутамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2); 29 – аспаргінсинтетаза (КФ 6.3.5.4); 30 – D-3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 31 - апофермент фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 32 – фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.33); 33 – серингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1)

## РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

В даній роботі буде використано метод твердофазового культивування, який часто використовують саме для культивування грибів. В основі цього методу є вирощування мікроорганізму на твердому середовищі, в якому відсутня зайва рідина. Даний метод культивування має багато переваг в порівнянні з рідиннофазовим культивуванням, а саме:

- Використовується недорогий та легкодоступний субстрат (пшеничні висівки, соєва макуха, жом цукрової тростини, бананові шкірки);
- Завдяки відсутності вільної вологи знижується ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами;
- Не має великого негативного впливу на навколишнє середовище, оскільки не передбачає великого використання води; [38]



Рис.5.1 Біореактор для твердофазового культивування із системою перемішування [39]

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ..	Арк..	Аркушів
Розроб.		Тузенко А.В.					36	91
Перевір.		Красінько В.О.						36
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Необхідний біореактор об'ємом 1000 л можна придбати від виробника Bailun Biotechnology Co. Він виготовлений з нержавіючої сталі та оснащений датчиками температури, тиску, CO<sub>2</sub>, а також мішалкою. [39]

## **5.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.**

Гриби роду *Trichoderma* є аеробними організмами [21], тому культивування, зокрема і твердофазне (Solid-state fermentation (SSF)), необхідно проводити з попередньою підготовкою аераційного повітря. Тому необхідно отримати достатню кількість повітря, чистого від сторонніх забрудників.

Забезпечити аерацію під час SSF легше, ніж при глибинному рідиннофазному культивуванні, завдяки швидкій дифузії кисню у вологій плівці, що оточує частинки субстрату, а також через великі поверхні контакту між газовою фазою, субстратом і повітряним міцелієм. Як правило, кисень не є обмежуючим фактором для SSF, коли субстрат складається з частинок. Однак у літературі [40] було показано, що збільшення швидкості повітряного потоку збільшує виробництво вторинних метаболітів. Відсутність аерації зменшує тепло- та масообмін при твердофазному культивуванні, що негативно позначається на продуктивності.

Загальноприйнятими методами забезпечення стерильності повітря є використання УФ-випромінювання (для знезараження повітря у приміщеннях) або методом фільтрування (для технологічного аераційного повітря, яке подається у ферментаційне обладнання).

Стадії підготовки аераційного повітря включають наступні етапи:

- спочатку атмосферне повітря збирається ззовні через вертикальну трубу з повітрязабірником. Точка забору повітря знаходиться на 2-3 м від найвищої точки будівлі, оскільки саме на такій висоті можна отримати доступ до найбільш чистого повітря.

- необхідно встановити фільтри попереднього очищення які призначені для очищення повітря від грубих механічних часток;
- далі повітря поступає до компресора та стискається для забезпечення аерації та подолання опору фільтрувальних матеріалів;
- повітря передається до ресивера задля подальшої стабілізації;
- головні фільтри, які розташовано поруч з ферментаційними відділеннями, попередньо очищують повітря від сторонніх мікроорганізмів до показника ступеня очищення повітря  $E=95\%$ ;
- від головних фільтрів повітря переходить до індивідуальних фільтрів де остаточно очищується до ступеня очищення  $E=99,99\%$ . Ці фільтри встановлюють на кожному ферментері.

Для попереднього очищення повітря застосовують глибинні або набивні фільтруючі елементи з волокнистих матеріалів. Вони можуть бути виготовлені з перхлорвінілового волокна, скловолокна або нержавіючої сталі, з товщиною волокон приблизно від 1,5 до 21 мкм. Принцип дії фільтру полягає в тому, що частинки пилу, які рухаються на великій швидкості, проходять крізь шар волокон і затримуються там за рахунок інерційного осадження. Набивні фільтри затримують 95-99% мікрочасточок. [42] Для створення індивідуальних фільтрів використовують базальтові надволокна. Також існують фільтри Петрянова, для виготовлення яких використовують тканину Петрянова. В складі цієї тканини знаходяться ультратонкі полімерні волокна, які наносять у вигляді тканини на марлеву підкладку. [41]

### **5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

У біотехнології одержання целюлаз миючі та дезінфікуючі засоби використовуються для забезпечення належного рівня асептики виробничого процесу. Оскільки целюлази виробляються мікроорганізмами, такими як гриби роду *Trichoderma*, дуже важливо запобігати забрудненню сторонніми мікроорганізмами, які можуть негативно вплинути на якість та активність кінцевого продукту. Миття та дезінфекція обладнання, ферментерів та виробничих приміщень дозволяють підтримувати оптимальні умови для росту продуцентів та позитивно впливає на ефективність біотехнологічного процесу. Також використання дезінфекційних засобів забезпечує безпеку працівників на виробництві.

#### **5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів**

**Даноксин** – засіб дозволений для застосовується в лабораторіях, на підприємствах харчової та переробної промисловості, агро-промислового комплексу, мікробіологічної, фармацевтичної, парфумерно-косметичної промисловості. Засіб належить до 3 класу помірно небезпечних речовин при введенні в шлунок та парентеральному введенні, до 4 класу мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру. Пил може викликати подразнення верхніх дихальних шляхів. [45]

**Терразим** – засіб призначений для використання в клінічних, біохімічних, бактеріологічних лабораторіях; на підприємствах парфумерно-косметичної, фармацевтичної, біотехнологічної, мікробіологічної промисловості; на заводах, фабриках, складах, сховищах, та приміщеннях для зберігання лікарських засобів. Робочі розчини засобу при одноразовому та багаторазовому нанесенні на шкіру не викликають подразнювальної шкірно-резорбтивної та сенсibiliзуючої дії. У рекомендованих для дезінфекції концентраціях не подразнює слизові оболонки очей та верхніх дихальних шляхів. [47]

**Лагоцид 600** – засіб використовують для профілактичної дезінфекції та проведення генеральних прибирань в лабораторіях різних підпорядкувань, в тому числі клінічні, біохімічні бактеріологічні, а також на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, біотехнологічної промисловості. Засіб відносять до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки) при введенні в шлунок та до мало небезпечних речовин (4 клас безпеки) при нанесенні на шкіру. У рекомендованих концентраціях не виявляє шкірно-подразнювальних властивостей та не подразнює слизову оболонку очей. [49]

**Фамідез® Деконтадез** – дозволений для використання в закладах охорони здоров'я, клініко-діагностичних, мікробіологічних, біохімічних, бактеріологічних, серологічних та інших лабораторіях, що працюють з потенційно інфікованим матеріалом, та на підприємствах харчопереробної промисловості, підприємствах і закладах фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної промисловості. Дозволено використовувати для дезінфекції і миття інвентарю, поверхонь усіх типів (підлога, стіни, двері тощо), твердих меблів, приладів, апаратури, устаткування з лакофарбовим, полімерним і гальванічним покриттям, санітарно-технічного обладнання. За параметрами гострої токсичності при введенні в шлунок належить до помірно небезпечних, а при нанесенні на шкіру до мало небезпечних речовин. [51]

**Дезекон ОМ** від BALTIACHEMI (Естонія) – використовується для миття та дезінфекції технологічного, холодильного обладнання, поверхонь приміщень (підлога, стіни, двері, підвіконня), виробничого обладнання; санітарного та спецодягу, сантехнічного обладнання, прибирального інвентарю, трубопроводів, резервуарів, внутрішньоцехового транспорту, тари, виробничого і столового посуду, інвентарю для миття посуду, дезінфекції систем вентиляції та кондиціонування повітря. Використовується на промислових підприємствах харчопереробної, фармацевтичної,

мікробіологічної та парфумерно-косметичної промисловості. Засіб відноситься до 4 класу небезпеки при нанесенні на шкіру та інгаляційній дії в умовах вільного випаровування; до 3 класу небезпеки при введенні в шлунок. [53]

У таблиці 5.3.1 наведено узагальнену характеристики шести різних мийно-дезінфікуючих засобів. Усі засоби мають широкий спектр антимікробної дії, ефективні проти бактерій, вірусів, грибів та спор. Засоби відрізняються за складом, формою випуску та застосовуються у вигляді робочих розчинів у різних концентраціях від 0,02% до 5% та різними способами обробки. Всі представлені засоби внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів.

На виробництві дотримання гігієни рук працівників є важливою умовою безпеки. Для цього ефективним рішенням є використання антисептичних засобів «Вінсепт» та «Фамідез® Деконтасофт». Це сучасні дезінфікуючі засоби, які швидко та надійно знищують бактерії, віруси і грибки, не потребують змивання та не пересушують шкіру. Засоби зручні у щоденному застосуванні і забезпечують високий рівень санітарної безпеки на підприємстві.

## Узагальнююча таблиця характеристики мийно-дезінфікувальних засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
<i>Засоби для дезінфекції рук пресоналу</i>								
<i>«Вінсепт» (рідина)</i>	діючі речовини: спирт етиловий – 67,5-70,0; спирт ізопропіловий – 1,0-2,5; 2-феноксіетанол – 0,05-2,5; гліцерин, пантенол, вода – до 100,0. За потребою може бути доданий ароматизатор.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Дезінфекційний засіб, що призначений для дезінфекції шкіри рук, шкірних покривів та для швидкої дезінфекції невеликих поверхонь. Використовується в будь-яких умовах, зокрема й за відсутності води, та не вимагає змивання зі шкіри або з поверхонь після нанесення	Відсутня шкірно-резорбтивної, сенсibiliзуючої, кумулятивних, гонадотропних, ембріотропних, ембріотоксичних, канцерогенних, мутагенних і тератогенних властивостей	Готовий до застосування. Не потребує змивання зі шкіри рук, тіла, поверхонь приміщень та інших об'єктів.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №179. Дата внесення: 14.04.2020 року. Термін дії до: 14.04.2025 року	850 грн за 5л	78,79
<i>Фамідез® Деконтасофт</i>	діючі речовини: 0,8 г полігексаметиленбігуанід у гідрохлориду, 0,8 г дідецилдиметиламонію хлориду кокоамідопропілбетаїн, кокамід ДЕА, запашка, кокоглюкозид, гліцерилмоноолеат, алкіламіноксид,	Бактерії, віруси, гриби, спори	Рідкий миючий засіб з антимікробною та противірусною дією, призначений для очищення та дезінфекції шкіри рук. Формула містить зволожувальні та пом'якшувальні компоненти, які дбайливо доглядають за шкірою, не викликаючи подразнення. Не містить фенолів і альдегідів, що робить його безпечним для частого використання.	Завдяки вмісту зволожувальних і пом'якшувальних компонентів, і, наближеному до природного рівня шкіри рН, добре сприймається шкірою. Сприяє підтриманню водно-ліпідного балансу та містить інгредієнти, що відновлюють захисний ліпідний бар'єр. Підходить для догляду за чутливою шкірою та може використовуватися для обробки слизових оболонок.	Гігієнічна дезінфекція рук здійснюється шляхом дворазового нанесення по 3 мл засобу без розведення, з витримкою не менше 30 секунд до повного висихання	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №76. Дата внесення: 01.04.2020 року. Термін дії до: 01.04.2025 року	735 грн за 5л	80,81

<i>Засоби для обробки внутрішньої поверхні обладнання</i>								
<i>Сода каустична</i>	NaOH	Бактерії, віруси, гриби, спори	Мийний лужний агент для очищення технологічного обладнання. Використовується для видалення сильних забруднень у вигляді жиру, копоти та нагару. Робота з речовиною потребує дотримання техніки безпеки, зокрема застосування захисних окулярів і рукавичок.	Використовується для миття виробничого обладнання та знежирення поверхонь. Не рекомендується для тефлонових, алюмінієвих і оцинкованих матеріалів. Якісно очищає об'єкти із нержавіючої сталі та скла	Розводять 2-2,5 мірні ковшки (50-62,5 грамів) на 10 літрів води. Також після миття необхідно промити водою	Мийний засіб відповідає згідно СТО 00203275-206-2007	52 грн за 5 кг	43,44
<i>Даноксин</i>	перкарбонат натрію – 50%-55%, тетраацетилетилендіамін 1 8%-25%; інгібітор корозії, хелатний комплекси, стабілізатори, мийно-очищуюча композиція (в т.ч. може включати катіонактивні тензиди чи ензими)	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб має мийні, очищаючі та дезодоруючі властивості, ефективно видаляє різноманітні забруднення. Випускається у формі порошку або гранул, що при розчиненні у воді виділяє активний кисень, забезпечуючи сильну антимікробну дію.	Видаляє забруднення органічного і неорганічного характеру з поверхонь, внутрішніх каналів, порожнин та інших важкодоступних місць. Добре змивається, не залишає нальоту і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці.	Засіб застосовується у вигляді робочих розчинів в концентрації від 0,05% до 2%. Способи обробки: протирання, зрошення, розпилювання, занурення, розпилення, механізована мийка	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №971. Дата внесення: 19.08.2020 року. Термін дії до: 19.08.2025 року	465 грн за 500 г	45,46
<i>Засоби для обробки поверхонь обладнання, приміщень</i>								
<i>Терразім</i>	перкарбонат натрію - 15,1%, тетраацетилетилендіамін - 9,9%, протеаза - 0,2%, ліпаза - 0,1%, амілаза - 0,1%, целюлаза - 0,03% (діючі речовини); інгібітори корозії, лимонна кислота, карбонат натрію, сульфат натрію, похідні ЕДТА, неіоногенні сурфактанти, комплексоутворювач, інші допоміжні речовини до 100,0.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Ефективний дезінфікуючий засіб, що очищає будь-які поверхні за лічені хвилини. Особливо рекомендується для складних інструментів, що мають довгі вузькі канали, порожнини та інші важкодоступні місця. Самостійно розчиняє забруднення та одночасно забезпечує високоєфективне знезараження.	Не ушкоджуються нержавіюча сталь, вироби зі скла, термостабільних і термолабільних матеріалів, гуми, каучуків, полімерних матеріалів, штучної шкіри, кахлю, порцеляни, фаянсу, дерева та інших матеріалів; ефективно розчиняють та видаляють органічні та неорганічні забруднення з поверхонь, із внутрішніх каналів, порожнин та інших важкодоступних місць	Засіб застосовується у вигляді робочих розчинів в концентрації від 0,02% до 4%. Способи обробки: протирання, зрошення, занурення.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №749. Дата внесення: 18.07.2020 року. Термін дії до: 18.07.2025 року	5 000 грн за 6 кг (833,3 за 1 кг)	47,48

Продовження таблиці 5.3.1

<p><i>Лагоцид 600</i></p>	<p>2,4- імідазолідіндіон - 1,3-дихлор-5,5-диметил - 8,0-12,0 (діюча речовина); 2,4- імідазолідіндіон-5,5-диметил; натрій триполіфосфат; аніонні ПАР; натрій карбонат; натрій хлористий; інгібітор корозії та інші функціональні добавки</p>	<p>Бактерії, віруси, гриби, спори</p>	<p>Високоєфективний порошкоподібний хлорвмісний дезінфікуючий засіб. Зберігає ефективність в присутності органічних забруднень. Безпечний при правильному використанні та рекомендований для профілактичної і поточної дезінфекції.</p>	<p>Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, виготовлені з корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, корозійностійким гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту</p>	<p>Засіб застосовується у вигляді робочих розчинів в концентрації від 0,02% до 5%. Способи обробки: протирання, зрошення, занурення, замочування.</p>	<p>Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №910. Дата внесення: 19.08.2020 року. Термін дії до: 19.08.2025 року</p>	<p>420 грн за 1кг</p>	<p>49,50</p>
<p><i>Фамідез® Екстра</i></p>	<p>алкілдиметилбензиламо нію хлорид (бензалконію хлорид) 22,0; гліюксаль – 9,0 (діючі речовини); неіоногенні ПАР &lt;5,0; інгібітор корозії, барвник &lt;0,1; вода - до 100,0.</p>	<p>Бактерії, віруси, гриби, спори</p>	<p>Комбінований концентрат з високою миючою здатністю для дезінфекції та чистки поверхонь та обладнання. Зручний у використанні, містить інгібітор корозії. Рецепттура засобу максимально гарантує безпеку персоналу, оскільки вона не містить летких альдегідів, таких як формальдегід чи глутаровий альдегід, не має сенсibilізуючої дії, практично без запаху</p>	<p>Робочі розчини засобу не ушкоджують об'єкти, що виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, добре змиваються з оброблених об'єктів, не залишають нальоту</p>	<p>Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації 0,25-5%, Дезінфекцію здійснюють зрошенням робочим розчином засобу або протирання ганчір'ям, що змочене робочим розчином засобу. Режим використання 0,25% - 60 хв</p>	<p>Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №77. Дата внесення: 01.04.2020 року. Термін дії до: 01.04.2025 року</p>	<p>586грн за 1л</p>	<p>51,52</p>

Закінчення таблиці 5.3.1

<p><i>Дезекон ОМ</i></p>	<p>діючі речовини, мас. %: дидецилдиметиламоніум хлорид – не менше 9,0; амінопропілдодецилпропандіамін – не менше 5,0; полігексаметиленбігуанід гідрохлорид – не менше 0,98</p>	<p>Бактерії, віруси, гриби, спори</p>	<p>Високоекономічний лужний низькопінний концентрований дезінфекційний засіб на основі композиції четвертинних амонієвих солей, амінів і бігуанідів для дезінфекції, комплексної мийки, дезодорування.</p>	<p>Не фіксують забруднення на поверхнях об'єктів обробки, добре змиваються, не залишають плям і нальоту, видаляють органічні забруднення. Робочі розчини не ушкоджують поверхні об'єктів, виготовлених з металів, скла, полімерних матеріалів, гуми, пластмас, лакофарбового, гальванічного покриття. Не знебарвлює і не знижує міцність тканин.</p>	<p>Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,02% до 5%. Способи обробки: ручний, зрошення, механізований, занурення, замочування, аерозольний.</p>	<p>Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №520. Дата внесення: 18.07.2020 року. Термін дії до: 18.07.2025 року</p>	<p>540 грн за 1 л</p>	<p>53,54</p>
--------------------------	---	---	--	--	--	--	-----------------------	--------------

44 – <https://absolut.lviv.ua/SodakaustuchnatverdauvuglyadiluskuОД-0080-ua>

46 – <https://hlorka.in.ua/ua/p1798536630-danoksin-500.html>

48 – <https://dlm.center/product/dezinficirujushhee-sredstvo-terrazim-6-kg-vedro-s-mernoj-lozhkoj/>

50 – <https://lagos.in.ua/ua/p1528380112-zasib-dezinfikuyuchij-lagotsid.html>

52 – [https://famidez.ua/index.php?option=com\\_virtuemart&view=category&virtuemart\\_category\\_id=19](https://famidez.ua/index.php?option=com_virtuemart&view=category&virtuemart_category_id=19)

54 – <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>

### 5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва целюлаз *Trichoderma harzianum*

Виробництво грибів *T. harzianum* здійснюється упродовж 300 днів і включає підготовку необхідного обладнання, а саме: збірник-змішувач для приготування соляної кислоти – 10л, збірник-змішувач для приготування пептону – 20л, збірник-змішувач для обробки рисової соломи – 300л, виробничий ферментер – 1 000 л, качалки, а також бокси та лабораторне обладнання.

Виробництво буде проводитися в лабораторному приміщенні для проведення різноманітних операцій та в цеху виробничого біосинтезу. У лабораторному приміщенні знаходиться все необхідне обладнання для проведення методів контролю, а також автоклави, бокс, термостати та холодильники.

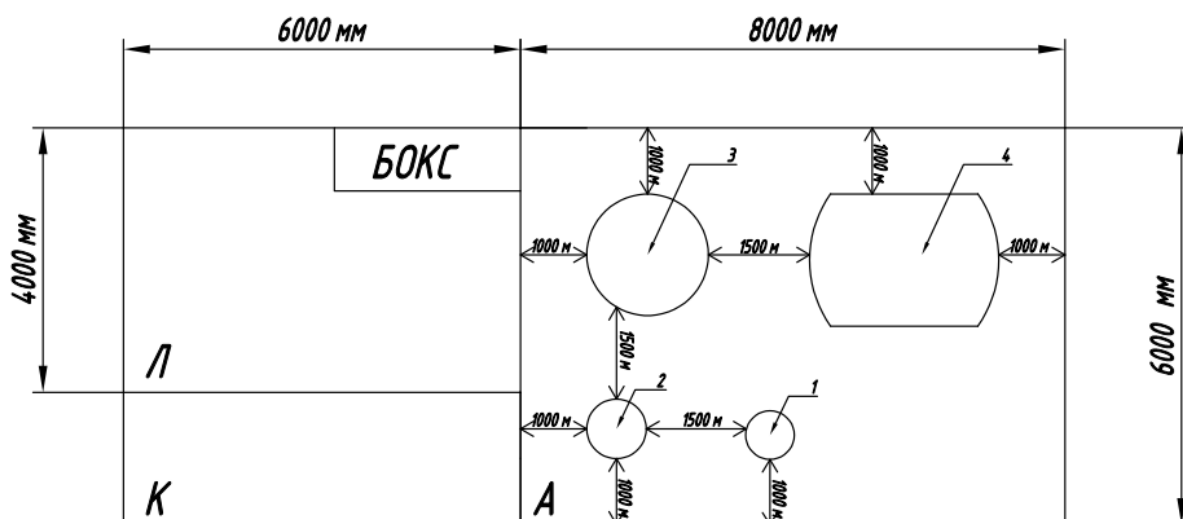


Рис. 5.3.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва целюлаз *Trichoderma harzianum*. (А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1 – збірник-змішувач (ЗЗ-10) об'ємом 10 л, 2 – збірник-змішувач (ЗЗ-12) об'ємом 20 л, 3 – збірник-змішувач (ЗЗ-16) об'ємом 300 л інокулятор, 4 – ферментер об'ємом 1000; Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками).

На виробництві буде використаний ферментер об'ємом 1 м<sup>3</sup> і при плануванні приміщення будемо керуватися чинними будівельними нормами. Отже, щоб визначити ширину будівлі обираємо найближче стандарте

значення, яке складає 14м. Довжина будівлі узгоджується з розмірами стандартних будівельних плит і становить 6 м. У табл. 5.3.2 наведені габаритні розміри основного обладнання.

Таблиця 5.3.2

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва  
целюлаз *T.harzianum***

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, мм	Висота, мм	Джерело
Ферментер	1 000	1 400	2 200	[29]
Збірник-змішувач (ЗЗ-10) для приготування соляної кислоти	10	370	630	[30]
Збірник-змішувач (ЗЗ-12) для приготування пептону	20	450	1150	[31]
Збірник-змішувач (ЗЗ-16) для обробки рисової соломи	300	920	1 929	[32]
<b>Всього</b>	<b>1 330</b>			

Підсумовуючи наведені в таблиці дані про розміри необхідного для синтезу обладнання, можна зробити висновок що загальний об'єм збірників-змішувачів та апарату для вирощування посівного матеріалу складає 1 330л.

Виробничі приміщення повинні залишатися чистими задля забезпечення належної якості виробництва кінцевого продукції. Тому миття підлоги проводиться кожен день, що складає 300 разів на рік. Також необхідно проводити генеральне прибирання приміщень, під час якого буде проводитися обробка стін, підлоги та вікон. Генеральне прибирання відбувається 10 разів на 300 днів.

Щоб вирахувати необхідну кількість миючих засобів спочатку розраховуємо приблизну загальну площу, яка буде оброблятися дезінфікуючими засобами. Оскільки висота найвищого апарату становить 2,3м за висоту приймаємо 4м. Площа підлоги цеху складає  $8 * 6 = 48 \text{ м}^2$ . Площа стін цеху розраховується за наступною формулою:  $((8 * 4) + (6 * 4)) *$

$2 = 56 \text{ м}^2$ . Загальну площу цеху визначаємо як суму площ підлоги та стін  
 $48+56 = 104 \text{ м}^2$ .  $24+16$

Табл. 5.3.3

**Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень  
целюлаз *T.harzianum***

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	48	56	104
Мікробіологічна лабораторія	24	40	64
Приміщення з качалками	12	32	44
<b>Загальна площа</b>	<b>84</b>	<b>128</b>	<b>212</b>

Виробництво целюлази відбувається за 106 циклів, а обладнання миють перед кожним циклом. Загальна кількість процесів миття обладнання за весь період розраховується також з урахуванням додаткового миття після останнього циклу і складає 107 разів. Загальний об'єм миття обладнання складає  $1\,330 * 107 = 142\,310 \text{ л} = 142,31 \text{ м}^3$ .

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.3.4*

Таблиця 5.3.4

**Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період виробництва целюлаз *T.harzianum***

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>3</sup>
Обладнання	1 330	107	142,31
Підлога	84	300	25,2
Стіни, двері, вікна	128	10	1,28

Щоб забезпечити чистоту ємнісного обладнання на виробництві використовують СІР-мийки. Витрати робочого розчину в загальному складають 20-30% від загального об'єму обладнання. Візьмемо середнє значення 25% та розрахуємо скільки робочого розчину буде витрачено для миття і дезінфекції 142,31 м<sup>3</sup> обладнання:

$$142,31 * 0,25 = 35,58 \text{ м}^3 \text{ засобу на рік}$$

Для обробки 1 м<sup>2</sup> в середньому використовується 100мл розчину для миття і дезінфекції. Щоб обрати засіб для обробки обладнання та приміщення, беруть до уваги такі параметри як: ефективність засобу, його вартість та витрати для обробки необхідної площі. Узагальнені дані щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів наведені у *табл. 5.3.5*

Згідно з результатами, наведеними в *табл. 5.3.5*, серед усіх досліджених мийних та дезінфекційних засобів найдоцільнішим вибором для обробки обладнання є сода каустична, а для очищення поверхонь обладнання, стін, вікон, дверей і підлоги – «Лагоцид 600». Ці засоби вирізняються невисокою загальною вартістю протягом усього виробничого циклу (300 днів), що є важливим економічним чинником, а також демонструють високу ефективність у застосуванні. Варто також враховувати необхідність запобігання формуванню стійких до дезінфекції мікроорганізмів, тому слід дотримуватися графіка чергування засобів кожні 1–3 місяці. Як альтернативу «ЕКЛІН-ОКСІ» можна використовувати «Даноксин» для миття обладнання, а замість засобу для обробки приміщень – «Фамідез® Екстра ». «Дезекон ОМ» та «Терразим» також можна використовувати для миття та дезінфекції приміщення, але їхня вартість є значно більшою.

Таблиця 5.3.5

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва целюлаз  
*T.harzianum***

<b>Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)</b>	<b>Об'єкт миття та/або дезінфекції</b>	<b>Концентрація робочого розчину, %</b>	<b>Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м<sup>2</sup></b>	<b>Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л</b>	<b>Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн</b>	<b>Вартість 1 л робочого розчину, грн</b>	<b>Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн</b>
Сода каустична	Обладнання	0,5	142,31	35 580	10,4	0,052	1 850,16
Даноксин (перкарбонат натрію)	Обладнання	0,25	142,31	35 580	900	2,325	82 723,5
Лагоцид 600 (2,4-імідазолідіндіон - 1,3-дихлор-5,5-диметил)	Поверхні обладнання, приміщень	0,3	168,79	42 197	420	1,26	53 168,22
Фамідез® Екстра (ЧАС)	Поверхні обладнання, приміщень	0,25	168,79	42 197	586	1,46	61 818,61
Дезекон ОМ (ЧАС)	Поверхні обладнання, приміщень	0,5	168,79	42 197	540	2,7	113 932
Терразім (перкарбонат натрію)	Поверхні обладнання, приміщень	0,5	168,79	42 197	833,3	4,17	175 820,8

## 5.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу целюлази *T. harzianum*

### 5.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

**Композиція А:** авіцел, натрієва сіль КМЦ, сечовина (режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв);

**Композиція Б:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  (режим стерилізації: 131 °С, 0.15 МПа, 40 хв);

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 0.15 МПа, 40 хв).

Композиція А складається із термолабільних компонентів та має відмінні умови стерилізації з меншою температурою та тиском, тому буде стерилізуватися окремо. Додатково компоненти необхідно поділити на композицію Б (сіль та сульфат) та В (фосфат), щоб попередити утворення осаду. Кількість необхідних компонентів для проведення стерилізації в колбах на качалках зазначена в таблиці 5.4.1

Таблиця 5.4.1

### Склад поживного середовища для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,9 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Авіцел	5	4,5	А	662,1
СМС	5	4,5		
Сечовина	0,3	0,27		
Вода	652,9			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4	1,26	Б	109,3
$\text{CaCl}_2$	0,3	0,27		
Вода	107,8			
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	1,8	В	128,6
Вода	126,8			
<b>Разом</b>		<b>12,3</b>		<b>900</b>

Інші компоненти ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ) знаходяться у досить малій кількості тому буде доцільно підготувати їх як запасний розчин.

#### 5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>

**Композиція А:** рисова солома, пептон (режим стерилізації 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв);

На даній стадії необхідно підготувати 564,7л поживного середовища. Даний об'єм середовища передбачає проведення стерилізації у ферментері. Спочатку в реактор додають рисову солому, де обробляють розчином кислоти. В окремому збірнику готують пептон та додають 10 л води. Готову наважку додають у ферментер з обробленою соломою та доливають залишок води.

Табл. 5.4.2

#### Склад поживного середовища для виробничого ферментера

Компонент поживного середовища	Вміст, кг/л	Кількість для приготування 564,7 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Солома	0,5	282	А	564,7
Пептон	0,005	2,82		
<b>Вода</b>		<b>223,41</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>56,47</b>		
<b>Разом</b>		<b>564,7л</b>		<b>564,7</b>

## РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт і виробничого біосинтезу

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник CZNP 100-OC («Darco»). Температура повітря до 250 °С. Матеріал: оцинкована листовая сталь. [55]
ФГО-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр повітряний панельний-гофрований (ТОВ «АероФільтр»). Вологість робочого середовища: $\leq 100\%$ , температура робочого середовища: $\leq 90$ °С, ефективність очищення: 80-95%. Габарити: 490x592x48, фільтраційна площа: 0,5 м <sup>2</sup> , початковий опір: 65Па. [56]
К-3	Компресор	1	Компресор PromInstrument PI-2x1450V50-370 Продуктивність на вході: 500 л/хв, р робочий тиск: 8 бар, кількість обертів двигуна: 2800 об./хв. [57]
Р-4	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 500-600-16-02 («ЗЕЛКО»). Об'єм л: 500; максимальний тиск: 16 бар; габаритні розміри, мм: 638 x 1800. [58]

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тузенко А.В.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт і виробничого біосинтезу	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					53	91
Реценз.								53
Н. Контр. Н.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження таблиці 6.1

ЗВ-5	Зволожувач	1	VERNER зволожувач повітря UT-Н18.0FL Продуктивність 18 л/год, споживана потужність 400 Ватт, витрата повітря 255 куб.м. /110Па [59]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр комірковий кишеньковий ФяК («Фолтер») Клас фільтру: F8/9, ефективність очищення: 98%, габаритні розміри, мм : 490x287 [60]
ОВД-7	Об'ємно ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор АФ – 50К («ТензоМир») Матеріал: вуглецева сталь, діапазон зважування: 10-50 кг, швидкість 800 шт/г, об'єм: 86 л, потужність: 50/60% гц.[61]
ДР-8	Дробарка	1	Молоткова дробарка CHOPPER – 500 Габаритні розміри: 1259x1292x1151 мм, номінальна напруга 380В [62]
ВС-9	Вібросито	1	Вібросито для просіювання сипучих речовин Швидкість: 3000 об/хв, габарити: 1500x800x1300 мм [63]
ЗЗ-10	Збірник-змішувач	1	Збірник-змішувач PJ-10L (Haitongda Co., Ltd) Об'єм 10л, потужність мішалки 0,6кВт, швидкість обертання до 3000 об/хв, габаритні розміри 370×320×630 мм [64]

Продовження таблиці 6.1

Л-11 Л-13	Лічильник води	2	Крильчастий лічильник для води BAYLAN TY+ 20. Макс. температура води: 50°C, макс. тиск: 16 бар, номінальна витрата: 4 м <sup>3</sup> /год. [65]
ЗЗ-12	Збірник-змішувач	1	Збірник – змішувач АС121-20 («ACHIEVE CHEM»). Об’єм 20л, швидкість перемішування: 600 об/хв, потужність двигуна: 120W, тиск 1-0,7 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь, оснащений: датчики контролю температури, тиску; мішалкою та сорочкою.[66]
ТР-14 (1) ТР-14 (2)	Транспортер горизонтальний	2	Транспортер соломи ТС-2,2 Швидкість рухомої площі: 9,9 м/хв, габаритні розміри: 6400x1750x1700 [67]
ЗЗ-16	Збірник-змішувач	1	Конічний змішувач RX-DZH-0.3 Габаритні розміри: 920x1929, потужність двигуна: 4 кВт об’єм 300 л, матеріал: нержавіюча сталь, оснащений системою розпилення рідини, нижнє вивантаження сировини[68]
ІФ-17	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр НРН70 – НЕРА («Hyundai») Фільтрувальний матеріал: скловолокно; Е = 99% ; габаритні розміри: 455x317x35. [69]

*Закінчення таблиці 6.1*

ФР-18	Ферментер	1	Бioreактор для твердофазової ферментації Vailun з нержавіючої сталі із системою перемішування Об'єм 1 м <sup>3</sup> , оснащений датчиками контролю температури, вологості, тиску, CO <sub>2</sub> ; обертовим валом та моторним приводом [70]
-------	-----------	---	---



вологості.

### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

До індивідуального фільтру (ІФ-17), який знаходиться безпосередньо біля виробничого устаткування, подають повітря (від ДР 1.6) задля його остаточного очищення до показника чистоти 99,99%.

### *ДР 2. Приготування розчину мікроелементів*

#### *ДР 2.1. Приготування та стерилізація запасного розчину*

На технічних вагах отримують наважку 1 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$  і поміщають в окремі колби на 250 мл. Мірним циліндром в кожену колбу додають 99 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0.15 МПа, протягом 40 хв.

### *ДР 3. Приготування розчину для обробки рисової соломи*

#### *ДР 3.1. Приготування соляної кислоти*

Перед початком культивування рисову солому обробляють соляною кислотою. Такий спосіб підготовки субстрату дає змогу отримати більшу концентрацію гідроксиметилфурфуролу. Згідно опорної статті співвідношення обробки кислоти до субстрату становить 1:20, а концентрація кислоти має бути 3.75N [16].

Для соляної кислоти нормальність збігається з молярністю (М), оскільки вона повністю дисоціює на іони  $\text{H}^+$  і  $\text{Cl}^-$ , а один молекулярний еквівалент кислоти дає один еквівалент  $\text{H}^+$ .

Отже, 3.75N  $\text{HCl}$  означає, що концентрація іонів  $\text{H}^+$  у розчині становить 3.75 моль/л, тобто це 3.75 М розчин соляної кислоти. Концентрована  $\text{HCl}$  (~37%) має щільність ~1.18 г/мл та молярність ~12 М. Для отримання 1 л 3.75N розчину потрібно приблизно 312 мл концентрованої  $\text{HCl}$  і довести об'єм до 1 л водою.

Щоб приготувати **5660** мл (**5.66** л) розчину соляної кислоти концентрацією **3.75N**, потрібно розрахувати об'єм концентрованої  $\text{HCl}$  (~37%, ~12М).

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1} = \frac{5,66 \times 3,75}{12} = 1.7675 \text{ л} = 1767.5 \text{ мл}$$

Щоб отримати 5,66 л 3.75N HCl, потрібно взяти 1767.5 мл (або 1.77 л) концентрованої 37% HCl. Спочатку за допомогою лічильника для води у збірник – змішувач, наливають 3,89 л води. Після чого додають 1,77 літри концентрованої кислоти. Потім розчин перемішують та зберігають до подальших стадій.

#### ***ДР 4. Попередня обробка рисової соломи***

##### *ДР 4.1, Подрібнення та просіювання рисової соломи*

Перед обробкою кислотою, рисову солому попередньо подрібнюємо на дробарці (Д-8), а після просіюємо на ситі (ВС-9). На виході маємо отримати дрібну фракцію, з розмірами часточок 500-1500 мкм. Після просіювання, субстрат завантажують до збірника (ЗЗ-16) для подальшої обробки.

##### *ДР 4.2, Обробка рисової соломи розчином соляної кислоти*

Подрібнену рисову солому (від ДР 4.1) подають в збірник-змішувач (ЗЗ-16) і додають 5,66 л розчину соляної кислоти (від ДР 3.1). Гідроліз проводять протягом години за температури 70°C. Отриману масу передають горизонтальним транспортером (ТР-14(2)) у ферментер (ФР-18) для подальшого культивування.

#### ***ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 5.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.*

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у таблиці 5.1.

##### *ДР 5.1.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 4,5 г авіцелу, 4,5 г натрієвої солі КМЦ та 0,27 г сечовини. Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл питну воду (652,9 мл),

перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

#### *ДР 5.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 1,4 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та 0,3 г  $\text{CaCl}_2$  і поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл питну воду (107,8 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С, 0,15 МПа, протягом 40 хв.

#### *ДР 5.1.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 1,8 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл і додають за допомогою мірного циліндра об'ємом 500 мл питну воду (126,8 мл), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа), протягом 40 хв.

#### *ДР 5.1.4 Змішування композицій А, Б і В*

У колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах зливають простерилізовані композиції А (від ДР 5.1.1), Б (від ДР 5.1.2) і В (від ДР 5.1.3). Після завершення процесу відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль.

### *ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 1000 л*

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері наведений в табл. 2.2.2.

#### *ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На об'ємно-ваговому дозаторі зважують 282 кг подрібненої рисової соломи. Після чого її завантажують до збірника, де обробляють розчином кислоти. Потім оброблену солому передають у ферментер. Паралельно на технічних вагах, зважують 2,8 кг пептону. Після чого наважку завантажують до збірника – змішувача, та за допомогою лічильника відміряють 10 л води, перемішують. До обробленої рисової соломи додають готовий розчин пептону, та додають весь інший залишок води композиції ( $\approx 213,41$  л),

перемішують та запускають процес стерилізації. Стерилізація проходить шляхом подачі пари в сорочку та всередину апарату. Параметри стерилізації дорівнюють 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

### ***ТП 6. Підготовка посівного матеріалу***

#### *ТП 6.1. Підтримання колекційної культури*

Отриману колекційну культуру *Trichoderma harzianum* зберігають у пробірці на картопляно – декстрозному агарі (potato dextrose agar) за температури 2-4 °С з пересівом 1-2 рази на місяць на свіже поживне середовище. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

#### *ТП 6.2. Одержання робочої культури*

Колекційну культуру *T. harzianum* розсівають на чашки Петрі із картопляно – декстрозним агаром, до одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 30 °С (48 год).

#### *ТП 6.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах*

Отримані ізольовані колонії *T. harzianum* із чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним картопляно – декстрозним агаром, (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 48 години, температура 30 °С. Пробірки візуально контролюють на однорідність морфологічних ознак

#### *ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках*

У пробірку з культурою *T. harzianum* (від ТП 6.3) додають 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають суспензію клітин і переносять до качалочних колб з поживним середовищем. Суспензію клітин, одержану з 1 пробірки, використовують для засіву 1 колби (в асептичних умовах додають у колбу зі стерильної композицією А).

Культивують на качалках (240 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 5 днів і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

### ***ТП 7. Виробничий біосинтез***

#### ***ТП 7.1. Виробниче культивування***

У виробничому ферментері об'ємом 1000л (ФР-18), в якому знаходиться стерильне середовище (від ДР 5.2.1) вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу (в асептичних умовах) вносять посівний матеріал з колб (від ТП 6.4). Культивують при температурі 30 °С упродовж 2 днів. Підтримання  $pO_2$  на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування.

Загальний час культивування складає 56 годин.

Кожні 8 год із ферментера відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення активності целюлази. Культивування завершують після досягнення максимальної целюлолітичної активності 16,13 МО/г.

## РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту

Основні стадії, які входять до процесу виділення та очищення ферменту целюлазного комплексу ферментів після SSF з твердого субстрату, наведені нижче. Ці етапи є ключовими для отримання ферментного препарату, придатного для подальшого використання для потреб кормового виробництва. Виділення ферменту проходить в 2 етапи:

**Екстрагування за додавання буфера.** В літературних джерелах описані різні екстракційні розчини, такі як натрій ацетатний буфер, NaCl, Ca(OH)<sub>2</sub>, Твін 80 і гліцерин [71]. Всі вони широко застосовуються для лабораторного призначення. На промисловому виробництві будемо використовувати цитратний буфер, як описано в статті [72]. Отже, після завершення культивування субстрат завантажують в реактор, обладнаний гвинтовим перемішувальним пристроєм. В реактор додають цитратний буфер концентрацією 0.05М з рН 4.8 у співвідношенні субстрату до буфера 1:20.

**Перемішування.** Отриману суміш перемішують зі швидкістю 200 обертів на хвилину протягом 1 години. [72] Для використання цього методу на виробництві будемо проводити змішування у реакторі з гвинтовим перемішувальним пристроєм. Час перемішування також збільшимо до 2-2,5 годин, а швидкість перемішування становитиме 80 об/хв.

Після виділення фермент проходить стадію очищення, яка в свою чергу включає наступні етапи :

**Фільтрація.** Суспензію після перемішування фільтрують через пластинчасті фільтри з метою відділення залишків твердого субстрату від рідини, яка містить екстраговані ферменти. Фільтрацію проводять при низькій температурі  $\leq 15$  °C. [73]

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення цільового продукту	Літ..	Арк..	Аркушіє
Розроб.		Тузенко А.В.					63	93
Перевір.		Красінько В.О.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

**Концентрація.** Фільтрат пропускається через ультрафільтраційну мембрану 30KD та концентрується до рівня активності ФПА від 600 до 800 одиниць/мл. [73]

**Обробка захисними агентами.** Відповідно до літературних джерел на даному етапі до ферменту додають 0,2% лактози та 0,5% діоксиду кремнію від загальної маси. Лактоза та діоксид кремнію слугують захисними агентами. Їх використання необхідне задля покращення кінцевого виходу активності ферменту на 23%. [73] Проте зважаючи на використання кінцевого продукту у кормових сумішах, буде доцільно додати лише лактозу.

**Розпилювальне сушіння.** Суміш переноситься в розпилювальну сушарку. Сушіння відбувається протягом 1-10 секунд, швидкість потоку повітря складає 1-20 м/с. [73] Температурний режим складає 70 °С. [74] Після цього етапу отримують порошкоподібний готовий продукт целюлази.



Рис 8.1 Схема післяферментаційних етапів отримання целюлаз *Trichoderma harzianum*

## РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

### 9.1 Мікробіологічний контроль

Культивування гриба *T. harzianum* з метою синтезу ферменту целюлази слід проводити в асептичних умовах. Дані умови необхідні для запобігання контамінації сторонніми мікроорганізмами. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ проводиться за допомогою розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі.

Для початку необхідно розплавити поживне середовище на водяній бані та розлити його в попередньо простерилізовані у сухожаровій печі чашки Петрі. Необхідно слідкувати щоб агар застигав рівномірно, тому доцільно буде залишити чашки Петрі на рівній поверхні кришками донизу. Зберігати чашки необхідно за температури 30°C протягом 2-3 днів. Для виявлення в поживному середовищі грибів та дріжджів проводять висів на сусло-агар (СА), а для виявлення бактерій здійснюють висів на м'ясо-пептонний агар МПА.

У випадку поживного середовища для твердофазового культивування, спочатку у асептичних умовах відбирають 1г середовища та переносять у стерильну колбу з 99 мл водопровідної води. Вміст колби ретельно перемішують, після чого відбирають 0,1мл проби. На етапі підготовки посівного матеріалу в колбах, з вже стерильного рідкого поживного середовища, стерильною піпеткою одразу відбирають 0,1 мл проби. Отримані проби рівномірно наносять на поверхню відповідного поживного середовища шпателем Дригальського або стерильною бактеріологічну петлю. Далі чашки з посівами загортають в папір та переносять в термостат.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	Літ..	Арк..	Аркушів
Розроб.		Тузенко А.В.					66	91
Перевір.		Красінько В.О.						66
Реценз.								
Н. Контр. Н.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

Умови для інкубації будуть наступні:

Для МПА

- температура 32-34 °С
- 1-2 доби

Для СА

- температура 24-26 °С
- 3-5 діб

Середовище можна визнати стерильним, якщо на поверхні не будуть помітні візуальні ознаки росту мікроорганізмів. [75]

## **9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту**

### **9.2.1 Визначення концентрації біомаси**

Концентрацію біомаси кількісно визначають за масою сухої клітини. Спочатку клітини висушують при 60°C до набуття постійної маси після чого двічі промивають стерильним фізіологічним розчином. Ця постійна вага і становить суху вагу клітин. [76]

### **9.2.2 Визначення ферментативної активності цільового продукту**

Визначення ферментативної активності цільового продукту здійснюється методом ДНС. Спочатку до 0,5 мл екстракту поверхневої культури додають 0.5 мл 2% розчину карбоксиметилцелюлози (КМЦ) в 0.05 М буфері натрію цитрату (рН 4.8) Отриманий розчин інкубують протягом 30 хв за температури 50°C. Після інкубації додають ДНС реагент та занурюють пробірки в окріп на 5 хв для припинення реакції.

Після інкубації визначають кількість цукрів, що утворилися внаслідок гідролізу КМЦ целюлазою. Визначення проводиться з використанням реактиву DNS (динітросаліцилової кислоти) та калібрувальної кривої на основі глюкози як стандарту. Активність ферменту целюлази виражається в мікромолях глюкози, що утворюються за одну хвилину на одиницю ферменту, отже 1 ОД ферменту целюлази виробляє 1 мкмоль глюкози за хвилину. [19]

Основними реактивами для проведення визначення є:

- 2% розчин КМЦ;
- буфер = 0,05 М цитрат натрію, рН 4,8;

- стандарти глюкози в буфері;
- динітросаліцилова кислота (ДНС) [19]

### 9.2.3 Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену

В даній роботі джерелом азоту є пептон. Для його визначення можна використати Біуретову реакцію. Біуретовий тест є колориметричною реакцією, і принцип методу полягає в зв'язуванні іонів купруму, які присутні у складі біуретового реактиву, з атомами азоту. Якщо середовище є лужним, утворюється фіолетове забарвлення.

Спочатку готують Біуретовий реактив: 1 г  $\text{CuSO}_4$  розчиняють у 100 мл дистильованої води, додають 1,2 г  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . 10 мл 10% розчину  $\text{NaOH}$  змішують із 100 мл 1% розчину  $\text{CuSO}_4$ . В пробірку додають досліджуваний зразок та Біуретовий реактив у співвідношенні 1:1. Пробірку ретельно перемішують та залишають на 3-5хв. Поява фіолетово забарвлення свідчить про наявність пептону. Якщо розчин в пробірці залишився синього кольору (колір Біуретового реактиву) означає відсутність у досліджуваному зразку пептону. [77]

Рисова солома буде виступати джерелом вуглецю, оскільки в своєму складі містить органічні сполуки, зокрема целюлозу. Для визначення целюлози використовують метод інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR). В основі даного методу є використання інфрачервоних спектрів для ідентифікації характерних зв'язків у досліджуваному зразку. [78] Враховуючи надлишкову наявність рисової соломи в середовищі, вуглець не є лімітуючим елементом у даному середовищі. Відповідно, немає необхідності у визначенні його концентрації.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Груздова, Т. В., and Т. М. Юхновська. "Перспективи розвитку сфери фармацевтики та біотехнологій із приєднанням України до угоди про асоціацію з Європейським Союзом." *Український соціум* 3 (2014): 63-77.D.B.
2. Live Animals Global Market Report 2024. *Global Market Research Reports & Consulting / The Business Research Company*. URL: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/live-animals-global-market-report>
3. CELLULASE ENZYME. Santos.com. URL: <https://www.santos.com/wp-content/uploads/2021/04/Cellulase-Revised-March-2021.pdf>.
4. Health benefits of Cellulase\_Chemicalbook. ChemicalBook. URL: <https://www.chemicalbook.com/article/health-benefits-of-cellulase.htm>
5. Akhtar, Nadeem & Aanchal, & Goyal, Dinesh & Goyal, Arun. (2016). BIODIVERSITY OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA AND THEIR APPLICATIONS. *Cellulose Chemistry and Technology*. 50. 9-10. URL: [https://www.researchgate.net/publication/312936132\\_BIODIVERSITY\\_OF\\_CELLULASE\\_PRODUCING\\_BACTERIA\\_AND\\_THEIR\\_APPLICATIONS](https://www.researchgate.net/publication/312936132_BIODIVERSITY_OF_CELLULASE_PRODUCING_BACTERIA_AND_THEIR_APPLICATIONS)
6. Zahran H. A. M. E. N. H. S. M. A. E. A. G. A.-E. K. H. H. A. M. O. Cellulase and Dairy Animal Feeding. *Science Alert*. URL: <https://scialert.net/fulltext/?doi=biotech.2010.238.256>
7. Wilson, Cellulases, Editor(s): Moselio Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition), Academic Press, 2009, Pages 252-258, ISBN 9780123739445, <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00138-3>
8. CELLULASE ENZYME. Santos.com. URL: <https://www.santos.com/wp-content/uploads/2021/04/Cellulase-Revised-March-2021.pdf>.
9. Cellulase - Enzymes - Our active ingredients - Therascience. Laboratoire THERASCIENCE. URL: [https://www.therascience.com/en\\_int/our-active-ingredients/enzymes/cellulase](https://www.therascience.com/en_int/our-active-ingredients/enzymes/cellulase)

10. Cellulase - Hazardous Agents | Haz-Map. Haz-Map - Hazardous Chemicals and Occupational Diseases Information. URL: <https://haz-map.com/Agents/12798>
11. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. IntechOpen - Open Science Open Minds | IntechOpen. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/66517>
12. Ahmed, Amer & Bibi, Aasia. (2018). FUNGAL CELLULASE; PRODUCTION AND APPLICATIONS: MINIREVIEW. LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences. URL: [https://www.researchgate.net/publication/323782984\\_FUNGAL\\_CELLULASE\\_PRODUCTION\\_AND\\_APPLICATIONS\\_MINIREVIEW](https://www.researchgate.net/publication/323782984_FUNGAL_CELLULASE_PRODUCTION_AND_APPLICATIONS_MINIREVIEW)
13. Sharada, Ravirala, Gogu Venkateswarlu and M . AnandRao. “APPLICATIONS OF CELLULASES - REVIEW.” (2014).
14. ДИГЕСТИН, інструкція, застосування препарату ДИГЕСТИН Сироп по 120 мл у флаконах. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/lixiview.php?id=5908>
15. Дігест 365 капсули по 50 мг №20 (10x2). tabletki.ua. URL: <https://tabletki.ua/uk/Дигест-365/1015454/>.
16. ВЕТОЗИМ ТРІО (кормова суміш порошок) купити в інтернет-магазині «Ветсинтез»: ціна, відгуки, фото, характеристики. Головна сторінка – Інтернет-магазин виробника «Ветсинтез». URL: <https://vetsintez.com/kormovaya-dobavka-vetozim-tro-poroshok>
17. Imran M., Anwar Z., Irshad M., Asad M. J., Ashfaq H. Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review. Advances in Enzyme Research. 2016, 4: 44-55. doi: 10.4236/aer.2016.42005. URL: [https://www.researchgate.net/publication/303594994\\_Cellulase\\_Production\\_from\\_Species\\_of\\_Fungi\\_and\\_Bacteria\\_from\\_Agricultural\\_Wastes\\_and\\_Its\\_Utilization\\_in\\_Industry\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/303594994_Cellulase_Production_from_Species_of_Fungi_and_Bacteria_from_Agricultural_Wastes_and_Its_Utilization_in_Industry_A_Review)
18. Sharma A., Tewari R., Rana S.S., Soni R., Soni S. K.. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. Appl Biochem Biotechnol. 2016, 179 (8): 1346-1380. doi: 10.1007/s12010-016-2070-3.

19. Kok Yong Syuan, Lisa Ong Gaik Ai, Tong Kim Suan, Evaluation of cellulase and xylanase production from *Trichoderma harzianum* using acid-treated rice straw as solid substrate, *Materials Today: Proceedings*, Volume 5, Issue 10, Part 2, 2018, Pages 22109-22117, ISSN 2214-7853 URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785318318765>
20. Kim, K.C. & Yoo, S.-S & Oh, Y.-A & Kim, S.-J. (2003). Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*
21. Sandle, T. (2014). *Trichoderma*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 644-646.
22. Bergey DH Krieg NR Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore MD: Williams & Wilkins; 1984/1989.
23. Корова, свиня чи курка. Яка тварина найрентабельніша – AgroReview. AgroReview. URL: <https://agroreview.com/content/korova-svynya-chy-kurka-yaka-tvaryna-najrentabelnisha/>
24. Утримання, годівля та доїння корів - Бібліотека BukLib.net. Головна - Бібліотека BukLib.net. URL: <https://buklib.net/books/34167>
25. Zahran H. A. M. E. N. H. S. M. A. E. A. G. A.-E. K. H. H. A. M. O. Cellulase and Dairy Animal Feeding. *Science Alert*. URL: <https://scialert.net/fulltext/?doi=biotech.2010.238.256>
26. Поголів'я ВРХ, у т.ч. корів: дані на 1 листопада 2023 року. URL: <https://skilky-skilky.info/v-ukraini-na-89-tys-koriv-menshe-nizh-torik/>
27. Українська молочна галузь в умовах війни: хроніки подій. MilkUA.info. URL: <http://milkua.info/uk/post/ukrainska-molocna-galuz-v-umovah-vijni-hroniki-podij>
28. ВЕТОЗИМ ТРІО (кормова добавка порошок) купити в інтернет-магазині «Ветсинтез»: ціна, відгуки, фото, характеристики. URL: <https://vetsintez.com/ua/kormovaya-dobavka-vetozim-tro-poroshok>
29. Балансування годівлі корів за сухою речовиною – журнал Пропозиція. Пропозиція - Головний журнал з питань агробізнесу. URL:

- <https://propozitsiya.com/ua/balansuvannya-godivli-koriv-za-suhoyu-rechovinoyu>
30. <https://vetsintez.com/index.php?route=product/search&search=%d1%86%d0%b5%d0%bb%d1%8e%d0%bb%d0%b0%d0%b7%d0%b0&description=true>
31. Целюлаза (Cellulase) > Купити Ціна. ENZIM Biotech - Магазин. URL: <https://enzim.shop/fermenty/cellyulaza>
32. Целюлаза - комплекс ферментів для зниження в'язкості GrainzymeNL, кг купити в BTS Engineering. BTS Engineering URL: <https://bts.net.ua/ua/enzymes-antiseptic-denatured-alcohol/enzymes/cellyulaza-kompleks-fermentov-dlya-snizheniya-vyazkosti-grainzymenl-kg/>
33. Boondaeng, Antika & Keabpimai, Jureeporn & Trakunjae, Chanaporn & Vaithanomsat, Pilanee & Srichola, Preeyanuch & Niyomvong, Nanthavut. (2024). Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. IN5: Parameter optimization and application. Heliyon. URL: [https://www.researchgate.net/publication/378414350\\_Cellulase\\_production\\_under\\_solid-state\\_fermentation\\_by\\_AspERGILLUS\\_sp\\_IN5\\_Parameter\\_optimization\\_and\\_application](https://www.researchgate.net/publication/378414350_Cellulase_production_under_solid-state_fermentation_by_AspERGILLUS_sp_IN5_Parameter_optimization_and_application)
34. KEGG PATHWAY: Starch and sucrose metabolism - *Trichoderma asperellum*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: <https://www.kegg.jp/pathway/tasp00500>
35. KEGG PATHWAY: Glycolysis / Gluconeogenesis - *Trichoderma asperellum*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: <https://www.kegg.jp/pathway/tasp00010>
36. KEGG PATHWAY: Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Trichoderma asperellum*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: <https://www.kegg.jp/pathway/tasp00250>

37. KEGG PATHWAY: Glycine, serine and threonine metabolism - *Trichoderma asperellum*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: <https://www.kegg.jp/pathway/tasp00260>
38. Behera, Sudhanshu & Kerketta, Ankush & Ray, Ramesh. (2023). Solid-state fermentation for the production of microbial cellulases. 10.1016/B978-0-443-19059-9.00012-8.
39. Solid State Fermentation Bioreactor Bailun Stainless Steel Fermenter with Stirring System. Made-in-China.com. URL: <https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/emMYthBKOPRE/China-Solid-State-Fermentation-Bioreactor-Bailun-Stainless-Steel-Fermenter-with-Stirring-System.html>
40. Fatma Gassara, Chandran Matheyambath Ajila, Satinder Kaur Brar, Rajeshwar Dayal Tyagi, Mausam Verma, José Valero, Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols, International Journal of Food Science and Technology, Volume 48, Issue 10, October 2013, Pages 2119–2126, <https://doi.org/10.1111/ijfs.12194>
41. Пирог, Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К. :НУХТ, 2009.
42. NovaFilter. Глибинні фільтри / *Продукція – Глибинні фільтри*. – 2025. URL: <http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/glibinn%D1%96>
43. Каустична сода. Інструкція та рекомендації до застосування. Статті компанії «MyChem». "MyChem" - ваш надійний інтернет-магазин хімії та реагентів. URL: <https://mychem.in.ua/ua/a480617-kaustichna-soda-instruktsiya.html?srsltid=AfmBOoqrMHKAPCsHmUglbVKDGRFpnuPUeJwLmrLRRQIjQgg3wbAHqT>
44. Сода каустична тверда у вигляді луски. Приватне підприємство «Абсолют центр». URL: <https://absolut.lviv.ua/SodakaustuchnatverdauvuglyadiluskuОД-0080-ua>

45. Інструкція щодо застосування засобу дезінфікуючого «Даноксин» з метою дезінфекції, дезінфекції високого рівня (ДВР), передстерилізаційного очищення та стерилізації. Виробник: ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ» (Україна)
46. Даноксин, 500 г. Купити за вигідною ціною 465 ₴. Інтернет-магазин "Хлорка" Дезінфекція та Розхідники в Україні. URL: <https://hlorka.in.ua/ua/p1798536630-danoksin-500.html>
47. ДЕРЖАВНА САНІТАРНО-ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА СЛУЖБА УКРАЇНИ. Методичні вказівки щодо застосування засобу дезінфекційного «Терразім (Terrazym)» з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення, дезінфекції високого рівня та стерилізації. Київ, 2016.
48. Дезінфікуючий засіб Терразім 6 кг (відро з мірною ложкою) – DLM. DLM. URL: <https://dlm.center/product/dezinficirujshhee-sredstvo-terrazim-6-kg-vedro-s-mernoj-lozhkoj/>
49. ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України». Методичні вказівки щодо застосування засобу «Лагоцид 600» з метою дезінфекції, стерилізації та достерилізаційного очищення. Київ, 2015.
50. Засіб дезінфікуючий "Лагоцид 600", 1кг: продаж, ціна у Києві. Мийні та чистячі засоби від "ТОВ "Лагос груп"" - 1528380112. "ТОВ "Лагос груп"" - контакти, товари, послуги, ціни. URL: <https://lagos.in.ua/ua/p1528380112-zasib-dezinfikuyuchij-lagotsid.html>
51. ТзОВ «ДезоМарк». Інструкція щодо застосування засобу "Фамідез® Екстра" з метою дезінфекції. Львів, 2019.
52. Фамідез® Екстра. Головна – ДезоМарк Фабрика дезінфекційних та мийних засобів. URL: [https://famidez.ua/index.php?option=com\\_virtuemart&view=category&virtuemart\\_category\\_id=19](https://famidez.ua/index.php?option=com_virtuemart&view=category&virtuemart_category_id=19)
53. ІНСТРУКЦІЯ застосування засобу "ДЕЗЕКОН ОМ" ("DISECON ОМ") з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення, 2020. Розроблено: ДУ

- «Інститут медицини праці НАМН України» за участю «Baltiachemi OU» (Естонія)
54. Дезекон ОМ ► дезінфікуючий засіб на основі композиції ЧАС ≡ Інтердез. Інтердез. URL: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>
55. Інтернет-магазин Top Kolgot. EuroKamin. URL: <https://eurokamin.com.ua/uk/shop/product/vozduhozabornyk-kruglyj-o-100>
56. ФВГ - фільтр повітряний Касетний/Гофрований, аерофільтр. URL: [https://aerofilter.ua/filtry\\_gofrirovannye.html](https://aerofilter.ua/filtry_gofrirovannye.html)
57. Компресор PromInstrument PI-2x1450V50-370. Краща ціна в Києві, Україні. Купити в Епіцентр. epicentrk.ua. URL: <https://epicentrk.ua/ua/shop/kompressor-prominstrument-pi-2x1450v50-370.html>
58. Ресивер повітряний горизонтальний (500 літрів, 16 Бар) синій ПЗВ 500-600-16-02 URL: <https://energopak.com/kompresorna-tehnika/resiveri/resiver-povitryaniy-gorizontalniy-500-litriv-16-bar-siniy-pzg-500-600-16-02/?srsrtid=AfmBOoqytB5fC4rXLA6g4jBs8awWronr9OEnvN1pqigmoG4rrJnHQJj4dWI>
59. Зволожувач повітря ультразвуковий, промисловий, купити в Києві. Unitech Clima. URL: <https://unitech-clima.com.ua/kataloh/zvolozhuvach-povitria/>
60. Купити коміркові кишенькові фільтри (ФЯК). Folter -. URL: <https://folter.tech/product/ochistka-pritochnogo-vozduha/fyak/>
61. Ваговий дозатор АФ - 50К - купити недорого в Україні | Кращі ціни, доставка - Tenzomir.com. tenzomir.com. URL: [https://tenzomir.com/katalog/vesovie\\_dozatori/весовой-дозатор-f103a-50k/](https://tenzomir.com/katalog/vesovie_dozatori/весовой-дозатор-f103a-50k/)
62. Молоткова дробарка CHOPPER - 500 (ID#947583882), ціна: 104500 ₴, купити на Prom.ua. prom.ua. URL: <https://prom.ua/ua/p947583882-molotkovaya-drobilka-chopper.html>

63. Вібросито для просіювання сипучих 1000x500 мм - купити у перевіреного продавця | Будтехнік. Інтернет магазин budprom.in.ua. URL: <https://budprom.in.ua/uk/stroitelnoye-oborudovaniye/vibrosita-i-proseivatel/vibrosito-dlya-proseivaniya-sypuchih-1000h500-mm>
64. Model PJ-10L Lab mixing tank. Made-in-China.com. URL: <https://haitongda.en.made-in-china.com/product/KBTJnSyGHXYI/China-Model-PJ-10L-Lab-mixing-tank.html>
65. Лічильник води 3/4"(dn 20) TУ+ вуличний, мокроход R 160 (клас "С") L=190мм Baylan (Туреччина): продаж, ціна у Дніпрі. Лічильники води від "ФОП Питлюк Руслан Ярославович" - 974842150. *Акватех, бойлер, котел, лічильник води, насос, тепла підлога, насосна група, гідрострілка, програматор, кульовий кран, група безпеки, твердопаливний котел, камін пелетний, сепаратор шламу, колектор, термоголовка, лічильник тепла, антипотоп, сололіфт.* URL: [https://akvateh.dp.ua/ua/p974842150-schetchik-vody-34dn.html?srsltid=AfmBOorHIaw\\_vzjdHobf8JPE6TS8Fpd3syKf\\_e155grrG50GIV4TkFxA](https://akvateh.dp.ua/ua/p974842150-schetchik-vody-34dn.html?srsltid=AfmBOorHIaw_vzjdHobf8JPE6TS8Fpd3syKf_e155grrG50GIV4TkFxA)
66. Реактор з нержавіючої сталі - Китайська фабрика виробників реакторів з нержавіючої сталі. *Виробники хімічного обладнання в Китаї, постачальники обладнання для пресів для таблеток, фабрика швидкої дистиляції\ДОСЯГТИ.* URL: <https://ua.achievechem.com/chemical-equipment/stainless-steel-reactor.html>
67. Транспортер соломи ТС-2,2 у Києві та Україні - купити, ціна. HYDROLIDER - гідравлічне обладнання, промислове та будівельне, спецтехніка. URL: [https://hydrolider.com.ua/ua/p1723722220-transporter-solomy.html?srsltid=AfmBOoq7lkjGnO14T9O-7xFuBegCADSro8FjfGv\\_ZfwSJAHaOYRb9jck](https://hydrolider.com.ua/ua/p1723722220-transporter-solomy.html?srsltid=AfmBOoq7lkjGnO14T9O-7xFuBegCADSro8FjfGv_ZfwSJAHaOYRb9jck)
68. High-Efficiency Conical Screw Ribbon Mixer for Industrial Blending. Made-in-China.com. URL: <https://rongxin688.en.made-in->

[china.com/product/nFyfqdoVIHtv/China-High-Efficiency-Conical-Screw-Ribbon-Mixer-for-Industrial-Blending.html](http://china.com/product/nFyfqdoVIHtv/China-High-Efficiency-Conical-Screw-Ribbon-Mixer-for-Industrial-Blending.html)

69. НРН70 - купити НЕРА фільтр для очищувача повітря Hyundai. *Hyundai*.

URL: <https://hyundai-hvac.com.ua/ua/hph70>

70. Solid State Fermentation Bioreactor Bailun Stainless Steel Fermenter with Stirring System. Made-in-China.com. URL: <https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/emMYthBKOPRE/China-Solid-State-Fermentation-Bioreactor-Bailun-Stainless-Steel-Fermenter-with-Stirring-System.html>

71. Campos, Alan & Asevedo, Estefani & Souza Filho, Pedro & Santos, Everaldo. (2024). Extraction of Cellulases Produced through Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* CCT-2768 Using Green Coconut Fibers Pretreated by Steam Explosion Combined with Alkali. *Biomass*.

URL: <https://www.mdpi.com/2673-8783/4/1/5>

72. Kok Yong Syuan, Lisa Ong Gaik Ai, Tong Kim Suan, Evaluation of cellulase and xylanase production from *Trichoderma harzianum* using acid-treated rice straw as solid substrate, *Materials Today: Proceedings*, Volume 5, Issue 10, Part 2, 2018, URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785318318765>

73. Xiong Peng, He Jianlong, Zhou Yuzhen (2014). *China Patent No.* CN102876647A, CN102876647B. Cellulase separation and purification method. URL: <https://patents.google.com/patent/CN102876647A/en>

74. Cruz, Erica & Talma, Simone & Batista Barbosa, João & Pires Bolzan, Raphael & Ladeira, Silvania & Carvalho, Raquel & Martins, Meire. (2024). Spray drying of cellulases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2. *Bioscience Journal*. URL: [https://www.researchgate.net/publication/379160768\\_Spray\\_drying\\_of\\_cellulases\\_produced\\_by\\_Bacillus\\_sp\\_SMIA-2](https://www.researchgate.net/publication/379160768_Spray_drying_of_cellulases_produced_by_Bacillus_sp_SMIA-2)

75. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-

- проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
76. Waheeb, M. S., Elkhatib, W. F., Yassien, M. A., & Hassouna, N. A. (2024). Optimized production and characterization of a thermostable cellulase from *Streptomyces thermodiastaticus* strain. *AMB Express*, 14(1), 129. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11582227/>
77. Biuret Test for Protein: Principle, Procedure, Results, Uses. *Microbe Notes*. URL: <https://microbenotes.com/biuret-test-for-protein/>
78. Abderrahim, Benarbia & Abderrahman, Elidrissi & Aqil, Mohamed & Fatima Ezahra, Tabaght & Abdesselam, Tahani & Krim, Ouassini. (2015). Kinetic Thermal Degradation of Cellulose, Polybutylene Succinate and a Green Composite: Comparative Study. URL: [https://www.researchgate.net/publication/325757468\\_Kinetic\\_Thermal\\_Degradation\\_of\\_Cellulose\\_Polybutylene\\_Succinate\\_and\\_a\\_Green\\_Composite\\_Comparative\\_Study](https://www.researchgate.net/publication/325757468_Kinetic_Thermal_Degradation_of_Cellulose_Polybutylene_Succinate_and_a_Green_Composite_Comparative_Study)
79. Вінсепт® (рідина), 5 л засіб для швидкої дезінфекції шкіри рук і тіла (ID#1494169468), ціна: 852 ₴, купити на Prom.ua. prom.ua. URL: [https://prom.ua/ua/p1494169468-vinsept-ridina-zasib.html?utm\\_source=google\\_pmax&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pmax&utm\\_campaign=Pmax\\_cpa\\_stomatologicheskie\\_instrumenty\\_i\\_inventar\\_265945592&utm\\_gad\\_source=1&utm\\_gad\\_campaignid=21931986603&utm\\_gclid=Cj0KCQjwxdXBBhDEARIsAAUkP6hIXpN1f9K8uCMd9x9DWmhApsB9pyvfXcRGku9BOPoThPPc7IGd00aAm6eEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1494169468-vinsept-ridina-zasib.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_stomatologicheskie_instrumenty_i_inventar_265945592&utm_gad_source=1&utm_gad_campaignid=21931986603&utm_gclid=Cj0KCQjwxdXBBhDEARIsAAUkP6hIXpN1f9K8uCMd9x9DWmhApsB9pyvfXcRGku9BOPoThPPc7IGd00aAm6eEALw_wcB)
80. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ щодо застосування засобу «Вінсепт» (рідина) з метою дезінфекції шкіри рук і шкірних покривів. Інтернет-магазин Дезцентр плюс. (2021). URL: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/metodychhi-bkazibky-shchodo-zactocyvannia-zacoby-bindez-chac-am-z-metoiu-dezifektsii-doctepylizatsiinoho-ochyshchennia-ta-ctepylizatsii/>

81. Фамідез® Деконтадез. Головна – ДезоМарк Фабрика дезінфекційних та мийних засобів. URL:

<https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/shkira-ruk-i-tila/dekontadez>

82. Антисептик для рук Фамідез Деконтадез 5л. *ROZETKA*, 2025. URL:

[https://rozetka.com.ua/ua/300610993/p300610993/?gad\\_source=1&gad\\_campaignid=20082255524&gclid=Cj0KCQjwxdXBBhDEARIsAAUkP6ixGOybJYq5Kr2Uw7HOskDJqIjWkbvg5dROEMEnDsKJ0IFUnae1HEaAkBfEALw\\_wcB](https://rozetka.com.ua/ua/300610993/p300610993/?gad_source=1&gad_campaignid=20082255524&gclid=Cj0KCQjwxdXBBhDEARIsAAUkP6ixGOybJYq5Kr2Uw7HOskDJqIjWkbvg5dROEMEnDsKJ0IFUnae1HEaAkBfEALw_wcB)

## ДОДАТКИ

# Evaluation of cellulase and xylanase production from *Trichoderma harzianum* using acid-treated rice straw as solid substrate

Kok Yong Syuan<sup>a</sup>, Lisa Ong Gaik Ai<sup>a,b</sup>, Tong Kim Suan<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Universiti Tunku Abdul Rahman, Jalan Universiti, Bandar Barat, 31900, Kampar, Perak

<sup>b</sup>Centre of Biodiversity Research, Universiti Tunku Abdul Rahman, Jalan Universiti, Bandar Barat, 31900, Kampar, Perak

### Abstract

Rice straw is an agricultural waste potentially producing cellulases and xylanases enzymes, which are important to industrials. The present study reports on the effect of the furan derivatives from the acid-treated rice straw on the production of cellulase and xylanase by *Trichoderma harzianum*. The content of furan derivatives in rice straw treated with hydrochloric acid, sulphuric acid, acetic acid and nitric acid was analyzed by HPLC. Hydrochloric acid-treated rice straw was found to contain the highest concentration of 5-hydroxymethylfurfural, 96.4 µg/g, but lower furfural content. The furan derivatives content of hydrochloric acid-treated rice straw with different number of times washing and enzymes production were studied by a 5-days solid state fermentation. The furan derivatives content did not show significant negative impact on the production of cellulase and xylanase. The highest cellulase and xylanase contents were found to be 12.7 U/g and 110.7 U/g respectively in 2-washes of hydrochloric acid-treated rice straw. A 10-days of time growth profile was conducted to evaluate the cellulase and xylanase production of hydrochloric acid-treated (2-washes) and untreated rice straw. The maximum cellulase production was 16.1 U/g at day 2 using hydrochloric acid-treated rice straw. However, the maximum xylanase activity (271.5 U/g) was found to produce at day 3 in untreated rice straw. The morphology of untreated, hydrochloric acid-treated (2-washes) and fermented rice straw was characterized using SEM and FTIR. The compositions of cellulose and hemicellulose were increased after acid-pre-treatment, and reducing sugars was increased after solid state fermentation. The production of cellulase in hydrochloric acid-treated rice straw is higher as compared to untreated rice straw, yet, xylanase production is more significant with untreated rice straw.

### 2.2. Rice straw collection and acid pre-treatment

Rice straw was collected from Padiberas National Berhad, Kompleks Bernas Sg. Manik, Perak, Malaysia. The collected rice straws were subjected to grinding process with the accompany of sieving process to standardize the size of the rice straws at 500 – 1500 µm. The processed rice straws were finally stored in a sealed container at room temperature prior to use.

During acid pre-treatment, rice straw was treated in acid solution with the concentration of 3.75N, with of 1:20 ratio under the condition of 70°C for 1 hour. The acid pre-treatment was conducted with sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), hydrochloric acid (HCl), nitric acid (HNO<sub>3</sub>), and acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH). After the acid treatment, the mixture containing acid solution and rice straw was filtered through a layer of gauze to separate the rice straw and hydrolysate. The rice straw was subjected to Soxhlet-extraction approach for furan derivatives extraction using chloroform, while the hydrolysate was extracted via liquid-liquid extraction using chloroform as well. To evaluate the effect of the number of times washing on the furan derivatives content and enzyme production of *Trichoderma* strain, acid pre-treated rice straw was subjected to washing after acid pre-treatment and the number of washes were 2, 4, 6, 8, and 10 respectively.

### 2.3. Solid-state fermentation process and condition

A substrate to moisture ratio of 1:1 was employed where 5g of rice straw was accompanied with the addition of 5 mL of 1% (w/v) peptone as a nitrogen source. The solid-state fermentation was initiated with the inoculation of five 50mm-diameter-plugs of *Trichoderma* spp. strain. The inoculated flasks were subsequently placed in an incubator and incubated at 30°C for the 5 days. For the time-profile study of the enzyme production of the *Trichoderma* spp. strain on acid-treated and untreated rice straw, the incubation period was up to 10 days. Enzyme was extracted with the addition of 0.05M sodium citrate buffer (pH 4.8), into the fermentation flask with the substrate to buffer ratio of 1:20 after fermentation. Then the solution was put onto a rotary orbital shaker at 200 rpm for 1 hour in room temperature. The filtrate was later being collected via filtration using gauze to remove the residue of biomass and substrate and subjected to centrifugation at 7000rpm for 30 min at 4°C. The resulting supernatants were used in determination of enzyme activity.

### 2.4. Determination of enzyme activity

For xylanase activity measurement, xylose released from the cleavage of 1.8 mL of 1% (w/v) xylan in 0.05M sodium citrate buffer (pH 4.8) by 0.2mL of enzyme extract was measured. The mixture of xylan, enzyme extract and buffer was incubated at 50°C for 5 min, before the addition of DNS reagent to stop the reaction. The determination of xylose released were measured via DNS method described by Miller [32] and was presented as 1 U of enzyme per gram of rice straw can produce 1 µmol xylose per minute. For the cellulase enzyme activity assay, 0.5mL of enzyme extract was added into 0.5mL 2% of CMC in 0.05M sodium citrate buffer (pH4.8) and the solution was subjected to incubation at 50°C for 30min. After the incubation, the determination of reducing sugar was carried out using DNS method as described above with a glucose standard curve as reference. The enzyme activity of the measured cellulase was presented as as 1 U of enzyme will produce 1 µmol glucose per minute.

The product of Soxhlet-extraction and liquid-liquid extraction was dissolved in methanol and subjected to HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis. The concentration of furan derivatives in rice straw was presented in mg of furan derivatives per gram of rice straw as calculated according to (eq1).

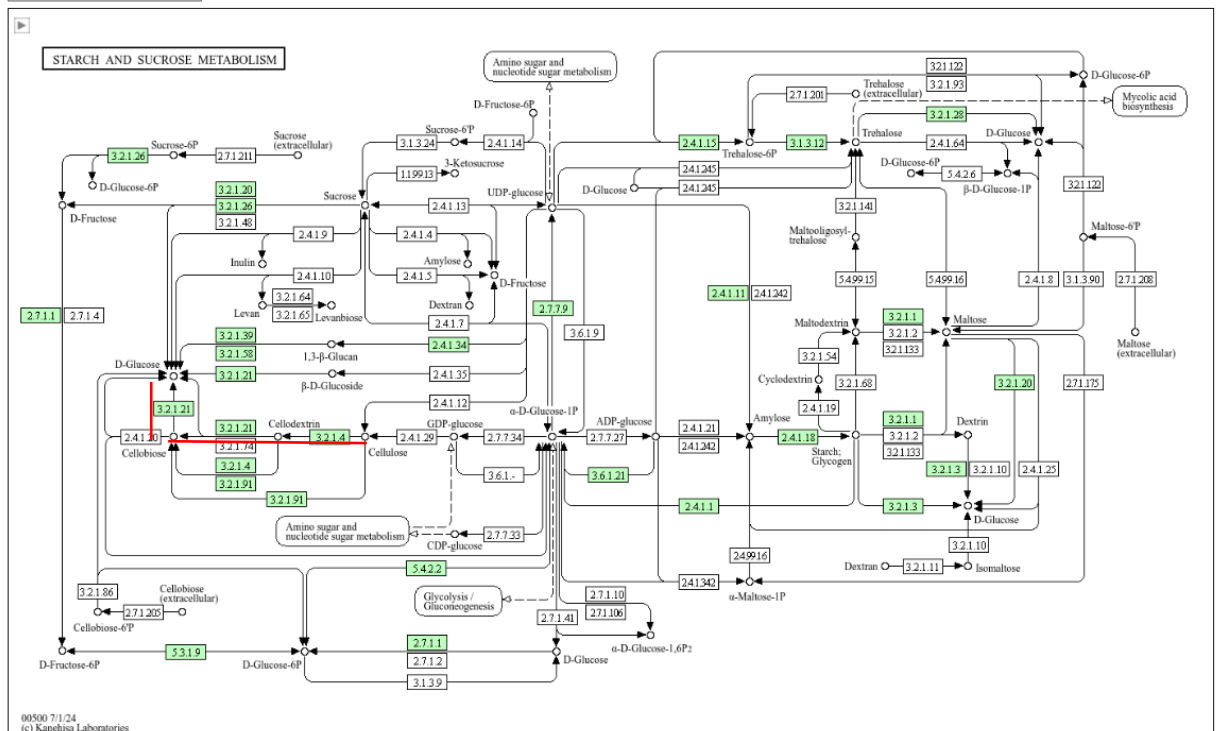
### 3.1. Identification of the *Trichoderma* spp. isolated

The *Trichoderma* spp. isolated grows rapidly on PDA agar whereby its mycelium forming white tuft covering the surface of the agar plate completely within 3 – 4 days. Flat pustules-like structures are observed with yellowish green shade powdery surface which later turn into dark greyish-green colour during spore formation after 4<sup>th</sup> day of growth. It is also important to note that the fungal isolate was found to be able to change the colour of the PDA agar from yellow into yellowish orange in colour. For microscopic structure of the *Trichoderma* spp., as shown in Figure 1, the conidia of the fungal isolates were sub-globose in shape, attaching on conidiophore which is in verticillate branching appearance. The primary branching of the conidiophore is slightly bend towards the apex and eventually growing longer towards the base. Furthermore, the lack of sterile elongation of the conidiophore is also one of the unique to take into consideration.

#### KEGG Starch and sucrose metabolism - *Trichoderma asperellum*

[ Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Download | Help ]

Change pathway type

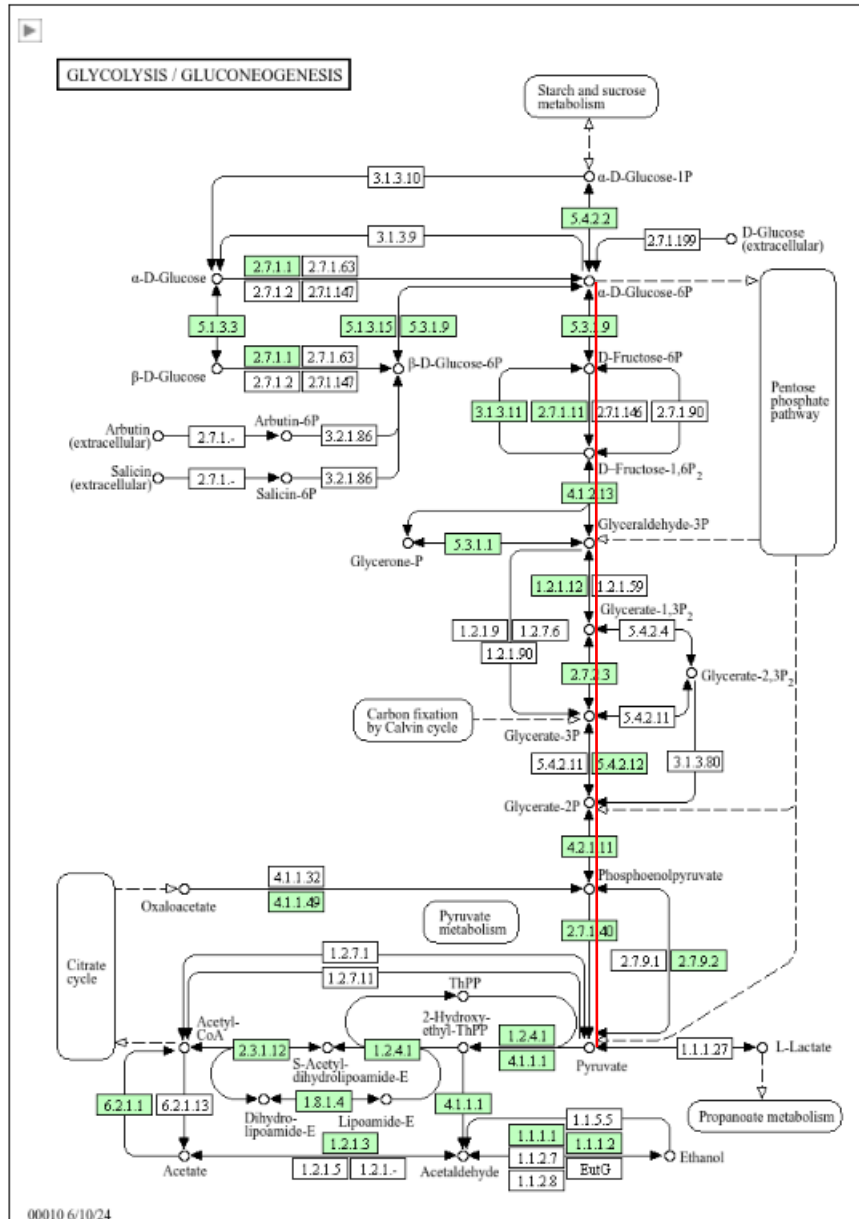




# Glycolysis / Gluconeogenesis - *Trichoderma asperellum*

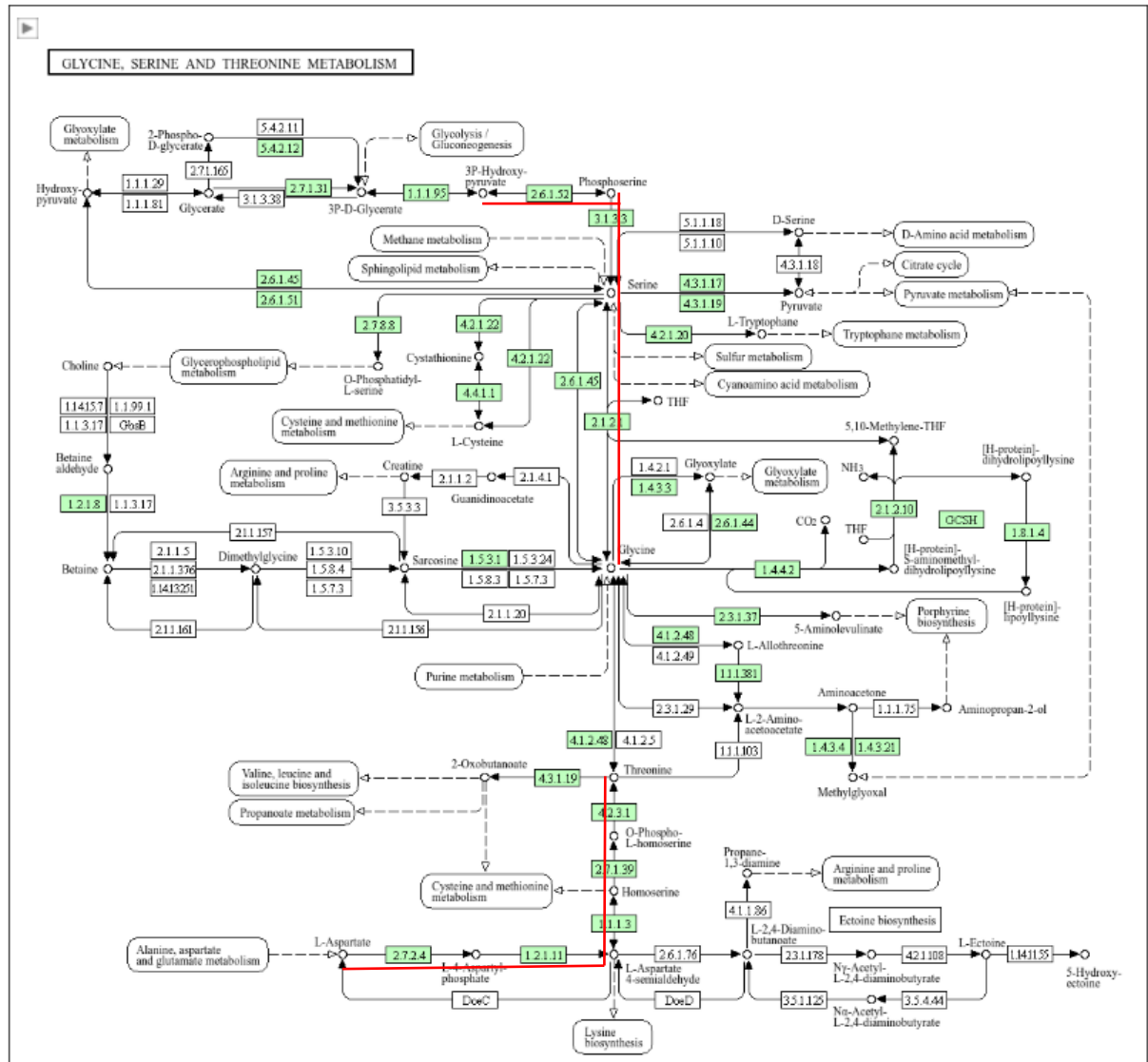
[ [Pathway menu](#) | [Organism group](#) | [Pathway entry](#) | [Show description](#) | [Download](#) | [Help](#) ]

Change pathway type



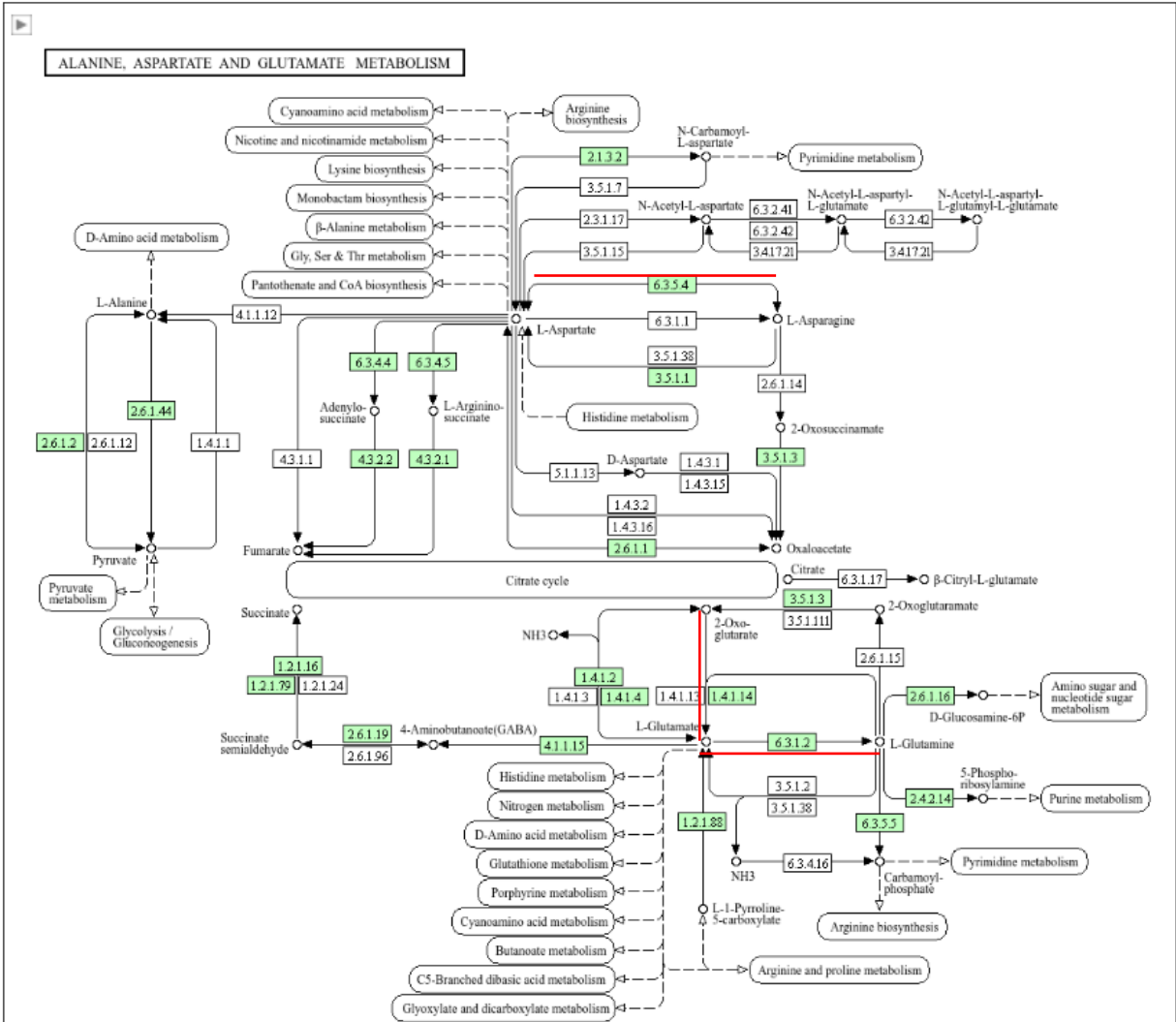
[ Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Show description | Download | Help ]

Change pathway type



[ [Pathway menu](#) | [Organism group](#) | [Pathway entry](#) | [Download](#) | [Help](#) ]

Change pathway type



Technical solution of the present invention is that the separating and purifying method of this cellulase may further comprise the steps:

(1) cellulase fermentations liquid filter press: cellulase fermentations liquid is the cellulase fermentations liquid that the liquid submerged fermentation method is produced, fermented liquid is removed large particulate matter and mycelia in the fermented liquid by filter press, filter cloth order number is 720,6 tons/hour of press filtration speed;

(2) cellulase sheet frame filtrate cryopreservation: cellulase sheet frame filtrate tanks is carried out low temperatures  $\leq 15^{\circ}\text{C}$  preservation with  $4^{\circ}\text{C}$  of water coolants;

(3) cellulase sheet frame filtrate ultrafiltration and concentration: the cellulase sheet frame filtrate behind the cryopreservation is concentrated into 600 ~ 800U/ml through the 30KD ultra-filtration membrane;

(4) cellulase ultrafiltration and concentration liquid pretreatment conditions: cellulase ultrafiltration and concentration liquid mixes with its quality 0.2% lactose and its quality 0.5% silicon-dioxide, the cellulose mixture enzyme material that stirs to get, cellulose mixture enzyme material filters out miscellaneous bacteria through 0.2um degerming film device;

(5) spraying drying cellulase powder-like product processed: the cellulase material that pretreatment conditions is crossed carries out spraying drying, spray-dired temperature in is  $130-150^{\circ}\text{C}$ , temperature out  $50-80^{\circ}\text{C}$ , the flow velocity of air-flow is 1-20m/s, and be 1s-10s time of drying.

---

## Procedure of Biuret Test

---

1. Label three test tubes as 'test', 'positive', and 'negative'.
2. In the test tube labeled as 'test', dispense 1-2 mL of sample, in the test tube labeled as 'positive', dispense 1-2 mL of albumin solution, and in the test tube labeled as 'negative', dispense 1-2 mL of distilled water.
3. In each tube, add an equal volume of (1-2 mL) of Biuret reagent.
4. Shake well and let it stand at room temperature for 5 minutes.
5. Observe the tubes for the development of violet color in the suspension.

## ІНСТРУКЦІЯ

щодо застосування засобу дезінфікуючого «Даноксин» з метою дезінфекції, дезінфекції високого рівня (ДВР), передстерилізаційного очищення та стерилізації

### 1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**1.1. Повна назва засобу** – Засіб дезінфікуючий «Даноксин», що виготовляється у відповідності із ТУ У 20.2-40220141-004:2017 .

**1.2. Фірма виробник** – «ДАНА МЕДКАЛ» (Україна),

**1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:** перкарбонат натрію – 50%-55%, тетраацетилетилендіамін 18%-25%; інгібітор корозії, хелатний комплекс, стабілізатори, мийно-очищуюча композиція (в т.ч. може включати катіоактивні тензиди чи ензими), інші необхідні функціональні складові. При розчиненні у воді виділяється активний кисень.

**1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.** порошок (мілкодисперсні гранули) білий або білий з блакитними вкрапленнями майже без запаху, 2% робочі розчини (за препаратом) мають слабкий запах сировини. Засіб не має окислювальних властивостей. рН 1,0% робочого розчину 8,0-10,0.

Робочі розчини мають гарні змочувальні, очищаючі, мийні, емульгуючі, знежирюючі та дезодоруючі властивості, низьке піноутворення, не фіксують органічні забруднення, ефективні для видалення біоплівки. Видаляють забруднення органічного і неорганічного характеру, в т.ч. застарілі, включаючи кров, сироватку, слиз, залишки лікарських препаратів, рентгенконтрастних речовин, змазок, і т.п. з поверхонь, внутрішніх каналів, порожнин та інших важкодоступних місць; добре змиваються, не залишають нальоту і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці; гомогенізують мокротиння, інші біорідини, виділення.

Засіб в робочих концентраціях не ушкоджує матеріали, поверхні із неіржавіючої сталі, алюмінію і його сплави, вироби зі скла, гуми, каучуків, полімерних матеріалів, штучної шкіри, кахлю, порцеляни, фаянсу, дерева та інших матеріалів; поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям; мають помірну корозійну дію у відношенні низьковуглецевих сталей; відбілюють текстиль без зменшення міцності тканин, видаляють плями (у т.ч. крові та інших біологічних рідин). Усуває неприємні запахи, в т.ч. пов'язані із ураженням об'єктів цвіллю.

971/2020	Засіб дезінфікуючий «ДАНОКСИН» (діючі речовини: перкарбонат натрію 50%-55%, тетраацетилетилендіамін (ТАЕД) – 18-25%)	ТОВ «ДАНА МЕДКАЛ», Україна	ТОВ «ДАНА МЕДКАЛ», Україна; ТОВ «ДЕЗАСАН», Україна	Засіб дезінфікуючий застосовується в закладах охорони здоров'я усіх профілів; аптечних закладах; лабораторіях; навчально-виховних та улюблених закладах різних рівнів акредитації; дитячих дошкільних закладах; у військових частинах; на підприємствах харчової та переробної промисловості, агро-промислового комплексу, мікробіологічної, фармацевтичної, парфумерно-косметичної промисловості, ресторанному господарстві, підприємствах громадського харчування та торгівлі; на об'єктах комунально-побутового обслуговування; на автомобільному, залізничному, авіаційному, водному транспорті та інших видах транспорту; закладах та установах соціального захисту, пенітенціарних установах, закладах зв'язку та банківських установах; в місцях загального користування, на інших епідемічно-значимих об'єктах, діяльність яких вимагає проведення дезінфекційних робіт відповідно до діючих санітарно-гігієнічних та протиепідемічних норм і правил, у вогнищах інфекційних хвороб, населенням у побуті, оптова та роздрібна торгівля. Державна реєстрація.	8/19/2020	8/19/2025	Інститут гігієни та екології Національного медичного університету О.О. Богомольця, висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/17411 від 06.08.2020 р.
----------	--	----------------------------	--	--	-----------	-----------	---

## ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу "Фамідез® Екстра" з метою дезінфекції

### 1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**1.1. Повна назва засобу – дезінфекційний засіб "Фамідез® Екстра"**

**1.2. Фірма виробник - ТзОВ "ДезоМарк" (Україна).**

**1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:** алкілдиметилбензиламонію хлорид (бензалконію хлорид) 22,0; гліюксаль – 9,0 (діючі речовини); неіоногенні ПАВ <5,0; інгібітор корозії, барвник <0,1; вода - до 100,0.

**1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.** Прозора рідина жовтого або світло блакитного кольору (колір засобу залежить від кольору використаного барвника). Має помірний специфічний запах поверхнево-активних речовин.

Добре розчиняється у воді. Робочі розчину засобу прозорі, мають слабкий запах поверхнево-активних речовин, виявляють мийні властивості, не ушкоджують об'єкти, що виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, добре змиваються з оброблених об'єктів, не залишають нальоту.

Засіб не сумісний з аніонними та неіоногенними поверхнево-активними речовинами, милами і окисниками.

77	засіб дезінфекційний «Фамідез® Екстра» (діючі речовини, мас.%: алкілдиметилбензиламонію хлорид- 22,0; гліюксаль – 9,0	ТзОВ "ДезоМарк". 81053, Україна, Львівська обл., Яворівський р-н, м. Новояворівськ, вул. Т.Шевченка, 18-Б. Тел./факс: (032) 227-61-22, 23, 24, 25. Ел.пошта: office.desomark@gmail.com, WWW: дезомарк.укр. Код за ЄДРПОУ: 30945492	ТзОВ "ДезоМарк". 81053, Україна, Львівська обл., Яворівський р-н, м. Новояворівськ, вул. Т.Шевченка, 18-Б. Тел./факс: (032) 227-61-22, 23, 24, 25. Ел.пошта: office.desomark@gmail.com, WWW: дезомарк.укр. Код за ЄДРПОУ: 30945492	заклади охорони здоров'я, клініко-діагностичні, мікробіологічні, біохімічні, бактеріологічні, серологічні та інші лабораторії, що працюють з потенційно інфікованим матеріалом; санітарний транспорт (у т.ч. машини швидкої медичної допомоги), донорські пункти та пункти переливання крові, медико-санітарні частини, фельдшерсько-акушерські та медичні пункти, об'єкти комунально-побутового обслуговування, підприємств харчопереробної промисловості, підприємств і заклади агропромислового комплексу, парфумерно-косметичної, фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної промисловості; заклади ресторанного господарства і торгівлі, дитячі дошкільні заклади, учбові заклади різних рівнів акредитації, аптеки і аптечні заклади, санаторно-курортні, спортивно-оздоровчі заклади різноманітного профілю, заклади соціального захисту (будинки престарілих, інвалідів), заклади зв'язку та банківські установи; всі види транспорту; установи пенітенціарної системи, митниця і прикордонна служба та інші об'єкти, діяльність яких вимагає додержання санітарно-гігієнічних норм та правил	01.04.2020	01.04.2025	Державна установа "Інститут медицини праці ім. Ю.І.Кудієва НАМН України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/25463 від 21.11.2019 р.
----	---	--	--	---	------------	------------	--

## ІНСТРУКЦІЯ

із застосування засобу «Дезекон ОМ» («Disecon OM») з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення

### 1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

**1.1. Повна назва засобу** – засіб дезінфекційний «Дезекон ОМ» («Disecon OM»);

**1.2. Виробник** – компанії «Baltiachemi OU» (Естонія);

**1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:** засіб (концентрат) містить дидецилдиметиламоніум хлорид – не менше 9,0, амінопропилдодецилпропандіамін – не менше 5,0, полігексаметиленбігуанід гідрохлорид – не менше 0,98 (активно діючі речовини); допоміжні компоненти: неіоногенна поверхнево-активна речовина, комплексонат, регулятор рН, барвник, ароматизатор, вода підготовлена – до 100,0.

**1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості.** Засіб «Дезекон ОМ» («Disecon OM») випускається у формі прозорого рідкого концентрату синього кольору з запахом ароматизатора. Засіб добре змішується з холодною і гарячою водою у будь-якому співвідношенні. Значення рН 1,0 % (за препаратом) водного розчину засобу становить  $10,0 \pm 0,5$  (при 20° С). Водні робочі розчини засобу прозорі, зі слабким запахом ароматизатора і помірним піноутворенням; мають мийні та дезодоруючі властивості, які посилюються при підвищенні температури робочих розчинів. **В рекомендованих режимах застосування розчини засобу не пошкоджують вироби з кольорових і чорних металів, скла, широкого переліку полімерних матеріалів (в т.ч. поліетилену, поліпропілену, полівінілхлориду, органолу, полікарбонату, полісульфону, поліметилметакрилату, поліуретану, акрілонітрілбутадієнстиролу, поліфенілсульфону, лінолеуму та ін.), різних видів гуми, штучної шкіри, чутливі до спиртів матеріали і лакофарбове і гальванічне покриття; не знебарвлюють і не зменшують міцність тканин; не фіксують забруднення на поверхнях об'єктів обробки; видалюють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові й лікарських засобів; за необхідності добре змиваються з оброблених поверхонь, не залишаючи плям і нальоту.**

744	Засіб дезінфекційний "ДЕЗЕКОМ ОМ" ("DISECON OM") - діючі речовини, мас. %: дидецилдиметиламоніум хлорид – не менше 9,0; амінопропилдодецилпропандіамін – не менше 5,0; полігексаметиленбігуанід гідрохлорид – не менше 0,98	Компанія «Baltiachemi OU», Естонія; Maagi 5, Maardu, 74114, Estonia, тел./ф.: +372-621-4694, E-mail: info@baltiachemi.ee.	Компанія «Baltiachemi OU», Естонія; Maagi 5, Maardu, 74114, Estonia, тел./ф.: +372-621-4694, E-mail: info@baltiachemi.ee.	заклади і установи охорони здоров'я, дитячі дошкільні, учбово-виховні і освітні, комунально-побутові, спортивно-оздоровчі, ресторанного господарства і торгівлі, <b>промислові підприємства, у т.ч. харчопереробної, фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної промисловості;</b> транспорт (в т.ч. пасажирський залізничний, автомобільний метрополітен, авіаційний, для перевезення харчових продуктів тощо), житлові і громадсько-адміністративні будівлі тощо, у побутових умовах. Оптова і роздрібна торгівля.	18.07.2020	18.07.2025	Державна установа "Інститут медицини праці НАМН України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/13229 від 17.06.2020 р.
-----	---	---	---	--	------------	------------	--

**Методичні вказівки**  
**щодо застосування засобу дезінфекційного «Терразім (Terrazym)»**  
**з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення, дезінфекції високого**  
**рівня та стерилізації**

**1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ**

**1.1. Повна назва засобу – дезінфекційний засіб «Терразім (Terrazym)».**

**1.2. Фірма виробник – «Prisman GmbH», Німеччина.**

**1.3. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:**

Склад засобу у вигляді порошку: перкарбонат натрію - 15,1%, тетраацетилетилендіамин - 9,9%, протеаза - 0,2%, ліпаза - 0,1%, амілаза -0,1%, целюлаза - 0,03% (діючі речовини); інгібітори корозії, лимонна кислота, карбонат натрію, сульфат натрію, похідні ЕДТА, неіоногенні сурфактанти, комплексоутворювач, інші допоміжні речовини до 100,0.

Склад робочих розчинів: надоцтова кислота, протеаза, ліпаза, амілаза, целюлоза, залишки перкарбонату натрію та тетраацетилетилендіаміну (діючі речовини); інгібітори корозії, лимонна кислота, карбонат натрію, сульфат натрію, похідні ЕДТА, неіоногенні сурфактанти, комплексоутворювач, інші допоміжні речовини до 100,0.

**1.4. Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу: «Терразім (Terrazym)»** - це порошок білого кольору з блакитними гранулами майже без запаху, 2% робочі розчини (за препаратом) мають слабкий запах оцту, розчини в концентрації 0,5% (за препаратом) і менше – практично без запаху. Мають високі змочувальні, очищувальні, миючі (миюча здатність не менше 85%), емульгуючі, знежирюючі та дезодоруючі властивості, низьке піноутворення, не фіксують органічні забруднення, ефективні для видалення біоплівки. Завдяки спільній дії ензимного комплексу та поверхнево-активних речовин самостійно розчинюються навіть ті забруднення, що важко видаляються, у т.ч. застарілі, прифіксовані (прикипілі) до поверхонь матеріалів (кров, слиз, сироватка, білкові, жирові та вуглеводні виділення та забруднення, хімічні речовини та реагенти, лікарські препарати, залишки рентгенконтрастних речовин та ін.) або які вже підсохли.

Наявність ефективного інгібітора корозії дозволяє попереджати корозію низьковуглецевих сталей у робочих розчинах, не ушкоджуються неіржавіюча сталь, не пошкоджують вироби зі скла, термостабільних і термолабільних матеріалів, гуми, каучуків, полімерних матеріалів, штучної шкіри, кахлю, порцеляни, фаянсу, дерева та інших матеріалів; поверхні медичних приладів і

2

устаткування з лакофарбовим, гальванічним і полімерним покриттям, мають відбілюючу дію на текстиль без зменшення міцності тканин, видаляють плями (у т.ч. крові та інших біологічних рідин); ефективно розчиняють та видаляють органічні та неорганічні забруднення (у т.ч. залишки крові, ліків, білкові, жирові, механічні та ін. види забруднень) з поверхонь, із внутрішніх каналів, порожнин та інших важкодоступних місць; добре змиваються, не залишають нальоту і плям на поверхнях об'єктів, що піддаються обробці; гомогенізують мокротиння та інші виділення.

749	Засіб дезінфекційний Терразім (діючі речовини: перкарбонат натрію – 15,10%, тетраацетилетилендіамин – 9,90%, протеаза – 0,20%, ліпаза – 0,20%, амілаза – 0,20%, целюлаза – 0,03%)	ТОВ «ДЕЗПЛАНЕТ», Україна, 03035, м. Київ, Солом'янська площа, буд. 2, тел.: факс: (044) 223-93-31, e-mail: dezplanet@ukr.net, код за ЄДРПОУ: 42100324	ТОВ «ДЕЗПЛАНЕТ», Україна, 03035, м. Київ, Солом'янська площа, буд. 2, тел.: факс: (044) 223-93-31, e-mail: dezplanet@ukr.net, код за ЄДРПОУ: 42100324. Адреса виробництва: 03035, м. Київ, Солом'янська площа, буд. 2	Заклади охорони здоров'я (у т.ч. фармацевтичні, аптечні), пенітенціарної системи, заклади оздоровлення та відпочинку, соціального захисту, спортивні об'єкти, лабораторії різних підпорядкувань, навчально-виховні, підприємства харчопереробної, фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, парфумерно-косметичної та мікробіологічної промисловості, військові частини, об'єкти сфери послуг, відпочинку та розваг, комунально-побутового призначення, ресторанного господарства і торгівлі, заклади (відділення) зв'язку, банківські установи, побут, транспорт	18.07.2020	18.07.2025	Державна установа "Інститут медицини праці НАМН України", м. Києво, державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/10525 від 08.05.2020 р.
-----	---	---	---	---	------------	------------	---

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ ЗАСОБУ “ЛАГОЦИД 600”  
З МЕТОЮ ДЕЗІНФЕКЦІЇ, СТЕРИЛІЗАЦІЇ  
ТА ДОСТЕРИЛІЗАЦІЙНОГО ОЧИЩЕННЯ**

**1 ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ**

**1.1 Назва засобу:** засіб дезінфікуючий “Лагоцид 600” за ТУ У 24.2 - 37063202 - 001:2010.

**1.2 Фірма виробник:** ТОВ “Лагос груп” (Україна).

**1.3 Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:**

2,4- імідазолідіндіон - 1,3-дихлор-5,5-диметил - 8,0-12,0 (діюча речовина);  
2,4- імідазолідіндіон-5,5-диметил; натрій триполіфосфат; аніонні ПАР; натрій карбонат; натрій хлористий; інгібітор корозії та інші функціональні добавки.

**1.4 Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу:** Порошок від білого до жовтуватого кольору з помірним запахом хлору. Водні розчини засобу “Лагоцид 600” прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Робочі розчини засобу не пошкоджують об’єкти, виготовлені з корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовим, корозійностійким гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту. Гомогенізують мокротиння та інші виділення. “Лагоцид 600” не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами та спиртами.

- для дезінфекції, у т.ч. суміщеної з достерилізаційним очищенням ручним і механізованим способом (у т.ч. в установках ультразвукового очищення), виробів медичного призначення із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, включаючи хірургічні і стоматологічні інструменти, жорсткі і гнучкі ендоскопи та інструменти до них та інших виробів;

- для стерилізації виробів медичного призначення з корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів;

- для поточної та заключної дезінфекції при кишкових і крапельних інфекціях бактеріальної (включаючи збудників туберкульозу), вірусної (включаючи збудників гепатитів, ВІЛ, кишкових вірусних інфекцій), грибової етіології (кандиди, дерматофіти, плісняві гриби);

- для профілактичної дезінфекції та проведення генеральних прибирань:

- у закладах охорони здоров’я (хірургічні, терапевтичні, акушерські, дитячі, патологоанатомічні, відділення інтенсивної терапії та реанімації та інші відділення; клінічні, біохімічні, бактеріологічні та інші лабораторії, станції швидкої та невідкладної допомоги, станції та пункти переливання крові тощо);

- в лабораторіях різних підпорядкувань;

- на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфюмерно-косметичної, харчопереробної промисловості, у закладах громадського харчування та торгівлі;

910	Засіб дезінфікуючий «Лягоцид 300», основними діючими речовинами якого є N,N-диметил-N-алкіл(С6-18)-бензолметанаміній хлорид у межах 15,0-20,0 %, N-(3-амінопропіл)-N-додецил-1,3-діамін у межах 2,0-6,0 %	ТОВ «Лягос груп», Україна, 02095, м. Київ, вул. Ахматової, буд. 45, тел: (044) 5720058, E-mail: lagosgroup@ukr.net , код за ЄДРПОУ: 37063202	ТОВ «Лягос груп», Україна, 02095, м. Київ, вул. Ахматової, буд. 45; адреса виробничих потужностей: м. Бровари, буд. Незалежності, 53/4 , тел: (044) 5720058, E-mail: lagosgroup@ukr.net , код за ЄДРПОУ: 37063202	Дезінфекція та стерилізація, у тому числі суміщення з достерилізаційним очищенням виробів медичного призначення, включаючи єдинокоси та інструменти до них, хірургічних і стоматологічних інструментів при вірусних, бактеріальних (включаючи туберкульоз) і грибкових (капсиди, дерматофіти) інфекціях; дезінфекція високого рівня (ДВР) єдинокосів, Поточна, заключна та профілактична дезінфекція в закладах охорони здоров'я, в тому числі лікувально-профілактичних закладах різного профілю, станціях переливання крові, аптеках, вогнищах інфекційних хвороб; підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, харчової і переробної промисловості, агропромислового комплексу (у тому числі тепличне господарство), ветеринарії; торгівлі, за'язку, комерційно-домутового обслуговування, транспорту (у тому числі залізничного, водного, повітряного, метрополітену), пенітенціарної системи, ресторанного, готельного та водовровідно-каналізаційного господарства; санаторно-курортних, соціального захисту, спортивно-оздоровчих, освітніх, навчально-виховних закладах усіх типів, незалежно від їх підпорядкування, форм власності і акредитації; перукарнях; косметологічних клініках і салонах (браси, татуажу), інших сфері послуг; банківських установах; об'єктах Міністерства Оборони України (у т.ч. військових закладах та частинах), СБУ, Національної поліції України, Державної служби з надзвичайних ситуацій України, Державної служби спеціального зв'язку та захисту інформації України, Державної пенітенціарної служби України; інших міністерств та відомств; населенням у побуті; зонах воєнних дій; місцях тимчасового проживання та масового перебування людей; інше згідно інструкції. Оптова та роздрібна торгівля (у тому числі аптечна мережа).	19.08.2020	19.08.2025	Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України , висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/16876 від 28.07.2020 р.
-----	---	--	---	---	------------	------------	---