

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« ___ » лютий 2026 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« ___ » лютий 2026 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,

промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Культивування *Trichoderma viride* для одержання целюлази

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

БАЛАЦЬКИЙ Максим Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувач Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав і не одержував недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2026 р.

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 ” грудня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БАЛАЦЬКОГО Максима Олександровича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Trichoderma viride* для одержання целюлази
керівник роботи доц., к.т.н., РЕЗНИЧЕНКО Юрій Миколайович,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року № 957-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 30.01.2026

3. Вихідні дані до роботи Цільовий продукт біосинтезу – целюлаза.
Біологічний агент - *Trichoderma viride*. Об'єм ферментера для виробництва
целюлази – 10м³, коефіцієнт заповнення складає - 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика целюлази. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення целюлази. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу на 1 аркуші формату А1

Апаратурна схема біосинтезу на 1 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика заквасок для виробництва житнього хліба	01–04.12.2025	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06–11.12.2025	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	12–15.12.2025	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	16–18.12.2025	
5	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	20–22.12.2025	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	25–28.12.2025	
7	РОЗДІЛ 7. Основні етапи виділення та очищення целюлази	28–30.12.2025	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	01–03.01.2026	
9	Вступ, реферат, список використаної літератури	04–06.01.2026	
10	Оформлення списку літературних джерел	07-09.01.2026	
11	Оформлення вступу та реферату	10–12.01.2026	
12	Оформлення презентації	13–15.01.2026	
13	Оформлення пояснювальної записки	16–20.01.2026	

Здобувач _____
(підпис)

Максим БАЛАЦЬКИЙ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена обґрунтуванню та розробці біотехнологічного процесу одержання целюлазного ферментного препарату з використанням мікроскопічного гриба *Trichoderma viride* для застосування у харчовій промисловості, зокрема у виробництві фруктових та овочевих соків. Актуальність дослідження зумовлена зростанням попиту на ферментні препарати як екологічно безпечні біокаталізатори, що забезпечують підвищення виходу соку, покращення його прозорості та стабільності.

У роботі наведено характеристику целюлази як багатокомпонентного ферментного комплексу, проаналізовано основні джерела їх біосинтезу та напрями промислового використання. Обґрунтовано вибір штаму *T. viride* Му як ефективного продуцента целюлази на основі порівняльного аналізу активності ферменту, тривалості культивування та вартості поживних середовищ. Проведено розрахунок складу поживного середовища, оцінено баланс вуглецю й азоту та визначено лімітувальний фактор росту біомаси.

Виконано техніко-економічне обґрунтування виробництва, розраховано річну потребу в целюлазі для сокової промисловості України, потужність виробництва, об'єм ферментера та кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Запропоновано глибинний спосіб культивування у ферментері об'ємом 10 м³ як технологічно доцільний і економічно ефективний.

Робота складається зі вступу, 8 розділів та списку використаної літератури (наведено 34 джерел та 38 посилань в тексті). Продемонстровано 5 рисунків та 12 таблиць. Графічна частина складається з технологічної та апаратурної схеми 1 та 2 листа формату А1 відповідно.

Ключові слова: целюлаза, *Trichoderma viride*, ферментні препарати, глибинне культивування, сокова промисловість, біотехнологія.

ABSTRACT

The qualification thesis is devoted to the substantiation and development of a biotechnological process for obtaining a cellulase enzyme preparation using the microscopic fungus *Trichoderma viride* for application in the food industry, in particular in the production of fruit and vegetable juices. The relevance of the study is determined by the growing demand for enzyme preparations as environmentally friendly biocatalysts that ensure an increase in juice yield, as well as improvement of its clarity and stability.

The paper presents a characterization of cellulases as a multicomponent enzyme complex, analyzes the main sources of their biosynthesis, and outlines the principal areas of industrial application. The choice of the *T. viride* My strain as an efficient cellulase producer is substantiated on the basis of a comparative analysis of enzyme activity, cultivation duration, and the cost of nutrient media. The composition of the nutrient medium was calculated, the carbon and nitrogen balance was evaluated, and the limiting factor of biomass growth was determined.

A techno-economic justification of production was carried out; the annual demand for cellulase in the juice industry of Ukraine, production capacity, fermenter volume, and the number of stages for inoculum preparation were calculated. Submerged cultivation in a fermenter with a working volume of 10 m³ is proposed as a technologically feasible and economically efficient method.

The thesis consists of an introduction, 8 chapters, and a list of references (34 sources and 38 citations in the text). 5 figures and 12 tables are presented. The graphical part includes technological and equipment flow diagrams, sheets 1 and 2, respectively, in A1 format.

Keywords: cellulase, *Trichoderma viride*, enzyme preparations, submerged cultivation, juice industry, biotechnology.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЮЛАЗИ.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	15
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	20
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів...22	
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.26	
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	26
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	30
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	32
4.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	33
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виращування інокуляту в посівних апаратах.....	34
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	38
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	39
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	42

РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦЕЛЮЛАЗИ.....	52
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	56
8.1. Мікробіологічний контроль.....	56
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	57
8.2.1. Концентрація біомаси (гранул).....	58
8.2.2. Концентрація та активність целюлази.....	58
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю (карбоксиметилцелюлоза натрієва).....	59
8.2.4. Концентрація джерела азоту (сульфат амонію).....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	62

ВСТУП

Харчова промисловість є однією з найбільш динамічних і стратегічно важливих галузей економіки, яка забезпечує населення продуктами харчування та концентратами для подальшої переробки. У сучасних умовах зростання попиту на високоякісні та безпечні продукти відзначається посилене впровадження технологій, що дозволяють підвищувати ефективність виробництва, мінімізувати втрати сировини та покращувати органолептичні властивості кінцевої продукції (Peres et al., 2025). Зокрема, у виробництві фруктових та овочевих соків важливим завданням є збільшення виходу соку, покращення його прозорості, стабілізація в'язкості та підвищення вмісту цільових цукрів та смакових компонентів (Singh, Kundu, Das, & Banerjee, 2019).

Для вирішення цих завдань у технологічних процесах широко використовуються ферменти як біокаталізатори, які дозволяють модифікувати структури рослинних кліткових компонентів без застосування агресивних хімічних реагентів. Серед найпоширеніших ферментів у харчовій промисловості виділяють пектинолітичні ферменти, амілази, протеази та целюлази, що забезпечують розщеплення відповідних полісахаридів та білкових компонентів сировини (Farhan et al., 2025). Використання ферментів у виробництві соків сприяє підвищенню прозорості, поліпшенню текстури, скороченню часу обробки та збільшенню виходу готової продукції (Toushik, Lee, Lee, & Kim, 2017).

Особливе значення серед цих ферментів має целюлаза, яка каталізує гідроліз β -1,4-глікозидних зв'язків у целюлозі, забезпечуючи руйнування клітинних стінок рослинної сировини та вивільнення клітинного соку. Целюлази застосовуються у виробництві соків з фруктів і ягід, що мають високу вміст клітковини, таких як яблука, груші, ананаси, морква та цитрусові. Використання целюлази дозволяє збільшити вихід соку, покращити його прозорість і

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Балацький М.О.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					7	66
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

стабільність, а також знизити в'язкість і піноутворення, що полегшує подальші технологічні стадії обробки та фасування (Singhania, Patel, Saini, & Pandey, 2017).

Актуальність дослідження зумовлена зростанням обсягів виробництва соків та концентратів в Україні та світі (Sokolyuk, Bondarenko, & Sokolyuk, 2025), що потребує розробки ефективних біотехнологічних методів підвищення продуктивності процесу та якості кінцевого продукту. Одним із перспективних напрямів є використання екзоферментів міцеліальних грибів роду *Trichoderma*, зокрема штаму *Trichoderma viride*, який характеризується високою ферментативною активністю, стабільністю у різних технологічних умовах та здатністю до масштабування виробництва. Розробка та оптимізація виробництва целюлази від таких штамів є важливим завданням для сучасної харчової біотехнології.

Новизною роботи є використання целюлази для обробки соків, одержану шляхом культивування *T. viride* My, культуральна рідина якої має активність ферменту в 607,35 Од/мл (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018).

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЮЛАЗИ

Целюлази належать до класу гідролітичних ферментів і є функціональною групою глікозилгідролаз, що каталізують розщеплення β -1,4-глікозидних зв'язків у молекулі целюлози — основного структурного полісахариду клітинних стінок рослин. У природних умовах ці ферменти забезпечують мінералізацію рослинної біомаси та відіграють ключову роль у глобальному вуглецевому циклі. У біотехнології целюлази розглядаються як одні з найважливіших ферментів для переробки відновлюваної сировини та створення екологічно безпечних виробничих процесів (You, Liu, Cui, & Feng, 2023).

Ферментний комплекс целюлази є багатокомпонентним і включає три основні типи ферментів, що діють синергічно (You, Liu, Cui, & Feng, 2023):

- Ендо- β -1,4-глюканази (ЕС 3.2.1.4) — здійснюють випадковий гідроліз внутрішніх β -1,4-зв'язків у аморфних ділянках целюлози, що призводить до зменшення ступеня полімеризації.
- Екзо- β -1,4-глюканази (целобіогідролази, ЕС 3.2.1.91) — відщеплюють целобіозні одиниці з кінців целюлозного ланцюга.
- β -глюкозидази (ЕС 3.2.1.21) — гідролізують целобіозу та короткі олігосахариди до глюкози, усуваючи інгібування попередніх ферментів продуктами реакції.

Сумарна дія цих ферментів забезпечує ефективний гідроліз целюлози до ферментованих моносахаридів (You, Liu, Cui, & Feng, 2023).

Синтез целюлаз властивий широкому колу мікроорганізмів, серед яких особливе промислове значення мають мікроскопічні гриби, бактерії та актиноміцети. Найбільш дослідженими та широко використовуваними продуцентами є гриби роду *Trichoderma* та *Aspergillus*, які характеризуються

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</i>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Балацький М.О.				РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЮЛАЗИ				
Перевір.	Резніченко Ю.М.			Літ.				Арк.	Аркушів
Реценз.								9	66
Н. Контр.				<i>Кафедра БТМ</i>					
Затверд.	Стабніков В.П.								

високою секретійною здатністю та ефективним гідролізом целюлози за помірних температур і кислих значень рН. Бактеріальні целюлази, зокрема синтезовані представниками родів *Bacillus* та *Clostridium*, часто відзначаються підвищеною термостабільністю та активністю в нейтральному або слабколужному середовищі, що зумовлює їхню перспективність для використання в екстремальних умовах промислових процесів (Chakraborty, Yadav, Saini, & Kuhad, 2019).

За своєю природою целюлази є білками з молекулярною масою, яка зазвичай коливається в межах від кількох десятків до понад 90 кДа і залежить від типу ферменту та джерела його походження. Більшість целюлаз проявляє максимальну каталітичну активність за температури 40–60 °С, тоді як ферменти термофільних мікроорганізмів здатні функціонувати за значно вищих температур. Оптимальні значення рН також варіюють залежно від продуцента, однак для грибних целюлаз характерна активність у слабокислому середовищі. На стабільність і активність ферментів істотно впливають фізико-хімічні чинники, зокрема іонний склад середовища, наявність інгібіторів, а також концентрація кінцевих продуктів гідролізу (Kumar, & Maravi, 2021).

Целюлази мають широке застосування в різних галузях промисловості, зокрема (Kumar, & Maravi, 2021):

- у біоенергетиці — для гідролізу лігноцелюлозної сировини з метою отримання біоетанолу;
- у харчовій промисловості — для покращення екстракції соків та стабілізації напоїв;
- у текстильній промисловості — для біополірування тканин і покращення їх споживчих властивостей;
- у целюлозно-паперовій промисловості — для біовибілювання та зменшення використання агресивних хімічних реагентів;
- у кормовиробництві — для підвищення перетравності рослинних кормів.

Завдяки високій специфічності, екологічній безпечності та ефективності целюлази є перспективними біокаталізаторами для сталого розвитку біотехнологічних процесів.

РОЗДІЛ 2
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Вибір біологічного агента є визначальним етапом при розробці біотехнологічного процесу одержання ферментних препаратів, зокрема целюлаз, оскільки саме властивості мікроорганізму-продуцента зумовлюють ефективність синтезу цільового продукту, стабільність процесу та його економічну доцільність. У цьому контексті штами мікроскопічних грибів *Trichoderma viride* є одними з найбільш перспективних біологічних агентів для промислового отримання целюлаз.

Гриби роду *Trichoderma* характеризуються високою целюлолітичною активністю, здатністю до інтенсивної секреції екзоферментів у культуральне середовище та відносною невибагливістю до умов культивування. *T. viride* є аеробним мезофільним мікроорганізмом, добре пристосованим до росту на рослинних субстратах, що містять целюлозу та її похідні. Важливою перевагою даного виду є здатність синтезувати повноцінний целюлазний комплекс, що включає ендоглюканази, екзоглюканази та β -глюкозидази, дія яких забезпечує глибокий гідроліз целюлозного субстрату. Крім того, целюлази *T. viride* характеризуються достатньо високою каталітичною активністю в умовах слабокислого середовища, що є технологічно зручним для більшості біотехнологічних процесів (Yao et al, 2023).

З біотехнологічної точки зору *T. viride* є безпечним продуцентом, оскільки не належить до патогенних або токсигенних мікроорганізмів, що істотно спрощує вимоги до біобезпеки виробництва. Штами цього виду добре піддаються селекції та адаптації, а також можуть бути використані як у

					НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Балацький М.О.			РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Перевір.		Резніченко Ю.М.					
Реценз.						12	64
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Порівняння штамів-продуцентів целюлази на прикладі *Trichoderma viride*

Продуцент	Склад поживного середовища в г/л	Умови культивування	Активність ферменту, Од/мл	Концентрація ферменту, г/л	Література
<i>Trichoderma viride</i> My	Карбоксиметилцелюлоза натрієва (СМС- Na) – 7,5 Tween-80 – 2 мл/л MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,3 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,4 K ₂ HPO ₄ – 2,0 CaCl ₂ – 0,3 FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,005 MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,0016 ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0014 CoCl ₂ – 0,002	30 °C 120 год (5 діб) 200 об/хв	607,35	-	Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018
<i>Trichoderma viride</i> IMB F- 100076	Карбоксиметилцелюлоза натрієва (СМС- Na) – 5 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 2,5 K ₂ HPO ₄ – 1,0 MgSO ₄ – 0,5 KCl – 0,5 FeSO ₄ – 0,01	26 °C 360 год (15 діб) pH 5,0	0,88	-	Pavlenko, Kopilov, Nadkernychna, Tsekhmister, & Kyslynska, 2022
<i>Trichoderma viride</i> BEOFB 1210m	Глюкоза – 10,0 NH ₄ NO ₃ – 2,0 K ₂ HPO ₄ – 1,0 NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O – 0,4 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5 Дріжджовий екстракт – 2,0	22±2 °C 168 год (7 діб) 160 об/хв Початкове pH 6,5	0,15	-	Galić, Stajić, & Ćilerdžić, 2022

поверхневому, так і в глибинному способах культивування, що розширює можливості масштабування процесу (Yao et al, 2023).

В табл.2.1. розглянуто декілька штамів *T. viride*, що синтезують целюлази.

Тож, з табл.2.1. очевидно, що найвища активність целюлази притаманна при культивуванні *T. viride* Му. Гірші результати за часом культивування та активності ферменту показують штами ІМВ F-100076 (0,88 Од/мл протягом 360 год) та ВЕОФВ 1210m (0,15 Од/мл протягом 168 год).

Для більш детального порівняння пропонується порівняти вартість поживного середовища в табл.2.2.

Таблиця 2.2.

Визначення вартості поживного середовища для одержання ферменту целюлази

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації*
<i>Trichoderma viride</i> Му	Карбоксиметилцелюлоза натрієва (СМС-Na) – 7,5	185	1,39	1
	Tween-80 – 2 мл/л	82	0,16	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,3	19,5	0,006	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,4	46,5	0,07	4
	K ₂ HPO ₄ – 2,0	360	0,72	5
	CaCl ₂ – 0,3	38	0,01	6
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,005	70	0,0004	7
	MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,0016	23	0,00004	8
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,0014	44	0,00006	9
	CoCl ₂ – 0,002	570	0,001	10
Вартість 1 л середовища ≈ 2,36 грн				
<i>Trichoderma viride</i> ІМВ F-100076	Карбоксиметилцелюлоза натрієва (СМС-Na) – 5	185	0,93	1
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 2,5	86	0,22	11
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	360	0,36	5
	MgSO ₄ – 0,5	19,5	0,01	3
	KCl – 0,5	24	0,01	12
	FeSO ₄ – 0,01	70	0,001	7
Вартість 1 л середовища ≈ 1,53 грн				
<i>Trichoderma viride</i> ВЕОФВ 1210m	Глюкоза – 10,0	40,8	0,41	13
	Дріжджовий екстракт – 2,0	705	1,41	14
	NH ₄ NO ₃ – 2,0	19,9	0,04	15
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	360	0,36	5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,5	19,5	0,01	3
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O – 0,4	39	0,02	16
Вартість 1 л середовища ≈ 2,25 грн				

Примітка: 1 - https://primehim.com/pishchevue-dobavki/kmts-karboksimitiltseulyloza-6000-7000?gclid=CjwKCAiA3-3KBhBiEiwA2x7FdCewB3C8RxzLUOWXPJbpKmeMQt4r4czIYJLuSOSXHHGsLUVSPv4zGxoCV_cQAvD_BwE, 2 - <https://megachem.com.ua/ua/tvin-80.html>, 3 - https://www.systopt.com.ua/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu?srsltid=AfmBOoorlJPjwWkgjkAoPbBTxfYi4PW3uV9vX_ZGHC7PmkkRIwsXsTl, 4 - <https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu-basf?srsltid=AfmBOoqTT3pfeQXA3-CNEOMuC2J0NQwvDx5d2rd92FnDPJtg42mYPOp9>, 5 - <https://www.systopt.com.ua/item-kalij-fosfornokyslyj-kaliyu-fosfat-2-zamishhenyj?srsltid=AfmBOopJr6LODXViCw1YNaDPIfwRE6dF90LjB32CeZAtAFGah5QORwci>, 6 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39344069-hlorid-kaltsiya-tehnicheskij.html>, 7 - https://xtc.com.ua/ua/p1828020516-sulfat-zheleza-zheleznyj.html?srsltid=AfmBOopk1W7YzTR96zoH_Q_9wfKd0y8F1wcr-lfmcZoZt4AThlo_T8w, 8 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39522639-sulfat-margantsa.html>, 9 - <https://prom.ua/ua/p847515155-sulfat-tsinka.html>, 10 - <https://soda.kiev.ua/p25769782-kobalta-hlorid-och.html>, 11 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39113976-fosfat-ammoniya.html>, 12 - <https://soda.kiev.ua/ua/p38528924-hlorid-kaliya.html>, 13 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-glyukoza?srsltid=AfmBOor82tseTy3fV30jBQi8tLPTiatSWCnN6wVtuspJC-m6JajV2TGA>, 14 - <https://vianoksgel.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html>, 15 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39114721-nitrat-ammiachnaya-selitra.html>, 16 - <https://soda.kiev.ua/ua/p39523656-fosfat-natriya-orto.html>

Тож, найдорожче середовище притаманне для культивування *T. viride* Му, а найдешевше – *T. viride* ІМВ F-100076. Остаточну картину продемонстровано в табл.2.3.

Таблиця 2.3.

Узагальнена таблиця продуцентів целюлази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність целюлази, Од/мл	Умовна вартість 1 Од целюлази, грн/Од	Тривалість культивування, год	Кількість утворених Од целюлази за годину, Од/год
<i>Trichoderma viride</i> Му	2,36	607,35	0,004	120	5,06
<i>Trichoderma viride</i> ІМВ F-100076	1,53	0,88	1,74	360	0,002
<i>Trichoderma viride</i> BEOFB 1210m	2,25	0,15	15	168	0,0009

Тож, з врахуванням прорахунків з табл.2.3 очевидним є вибір штаму *T. viride* Му, оскільки він має найменшу умовну вартість ферменту та найвищу швидкість утворення целюлази.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

З врахуванням того, що в статті відсутні дані щодо концентрації целюлази, приймемо усереднене значення 1 г/л. Джерелом вуглецю в середовищі виступає карбоксиметилцелюлоза натрієва ($C_6H_7O_2(OH)_2CH_2COONa$), а азоту – сульфат амонію.

Молярна маса карбоксиметилцелюлози натрієвої (мономеру) 226,16 г/моль, в той час як молярна маса карбону в ній становить $12 \cdot 8 = 96$ г/моль. Тож, в 226,16 г карбоксиметилцелюлози натрієвої міститься 96 г карбону. Тоді, в 7,5 г СМС-На $7,5 \cdot 96 / 226,16 = 3,18$ г карбону. Половина піде на холосте окислення, тоді кількість доступного вуглецю становитиме $3,18 / 2 = 1,59$ г

В білках усереднено міститься 30% карбону (Ekanbaram et al., 2014). Тоді, для одержання 1 г фермент потрібно $1 \cdot 0,3 = 0,3$ г карбону. Кількість вуглецю, що залишається на синтез біомаси становить $1,59 - 0,3 = 1,29$ г.

До біомаси грибів входить до 50% карбону (Hawkins et al., 2023). Отже, з 1,29 г карбону можна отримати $1,29 / 0,5 = 2,58$ г біомаси.

До білків входить близько 16% азоту (Tipton, & Wolfe, 2004). Молекулярна маса сульфату амонію становить 132,14 г/моль. З них на азот припадає $14 \cdot 2 = 28$ г/моль. Тож, в 1,4 г кількість азоту становитиме $1,4 \cdot 28 / 132,14 \approx 0,3$ г. Для одержання 1 г ферменту потрібно $1 \cdot 0,16 = 0,16$ г. Тоді, на синтез біомаси піде $0,3 - 0,16 = 0,14$ г.

До грибної біомаси входить до 10% азоту (Brabcová, Štursová, & Baldrian, 2018). Тож, з 0,14 г азоту можна отримати $0,14 / 0,1 = 1,4$ г. Тож, азот буде лімітувальним фактором росту.

Склад середовища залишаємо незмінним, оскільки достеменно невідомо яка кількість ферменту та біомаси було одержано під час культивування.

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

Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента є важливими характеристиками, що визначають його ідентифікацію, адаптацію до умов культивування та біотехнологічну придатність. Для штамів

мікроскопічних грибів *T. viride* ці ознаки мають низку специфічних особливостей, які зумовлюють їх широке використання як продуцентів целюлаз.

T. viride належить до нитчастих аеробних грибів і характеризується добре розвиненим, багатоклітинним, сильно розгалуженим міцелієм. Гіфи зазвичай тонкі, прозорі або слабкопігментовані, з чітко вираженими септами, що забезпечує інтенсивний ріст і значну площу контакту клітин з поживним середовищем. У процесі росту гриб формує характерні конідієносці з розгалуженою структурою, на яких утворюються одноклітинні конідії округлої або еліпсоїдної форми. Конідії *T. viride* зазвичай мають зелене або яскраво-зелене забарвлення, що зумовлює типовий колір колоній і є однією з діагностичних ознак цього виду (Schuster, & Schmoll, 2010).

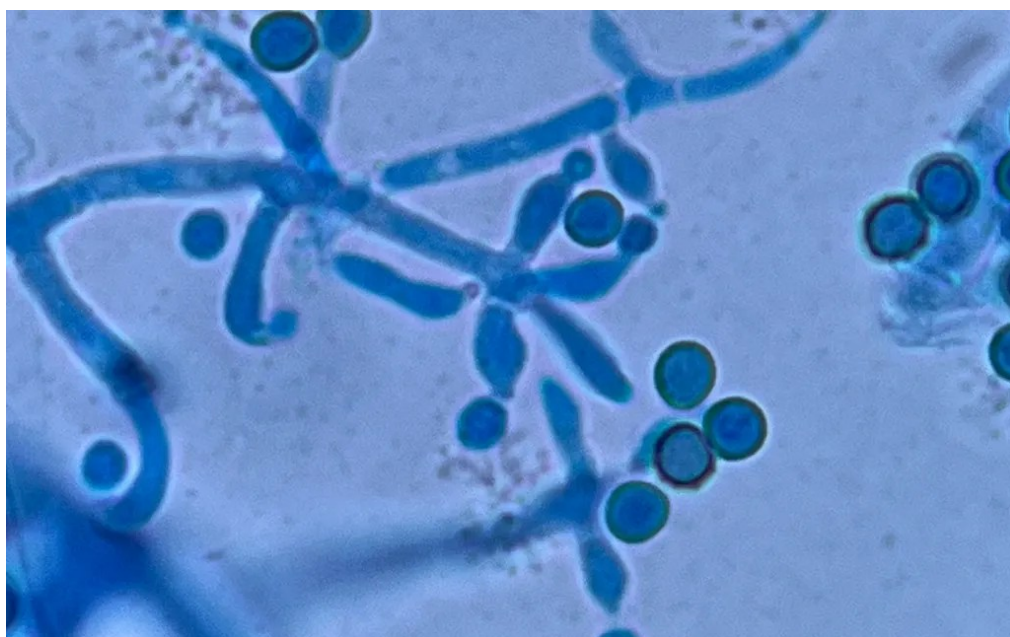


Рис.2.1. Міцелій та конідії *T. viride* у світловому мікроскопі (збільшення 1000x) (<https://www.gba-group.com/en/blog/environment/schimmelpilz-trichoderma-viride/>)

При культивуванні на щільних поживних середовищах колонії *T. viride* швидко ростуть, мають щільну або пухку текстуру та добре виражену зональність. Початково колонії зазвичай білого кольору внаслідок активного росту вегетативного міцелію, проте з розвитком спороношення набувають зеленого або темно-зеленого відтінку. Зворотний бік колоній, як правило, безбарвний або злегка жовтуватий (Zheng et al., 2021).



Рис.2.2. Колонії *T. viride* 01 PP на картопляно-декстрозному агарі (Shahid et al., 2014)

З фізіолого-біохімічної точки зору *T. viride* є строгим аеробом, що зумовлює його високу потребу в кисні під час глибинного культивування. Оптимальні умови росту і метаболічної активності зазвичай спостерігаються за температури 25–30 °С та в слабкокислому діапазоні рН, що узгоджується з умовами індукованого синтезу целюлаз. Гриб характеризується інтенсивним вуглеводним обміном і здатністю ефективно використовувати складні полісахариди рослинного походження, зокрема целюлозу та її похідні, як основні джерела вуглецю й енергії (Liu et al., 2025).

Біохімічною особливістю *T. viride* є висока ферментативна активність, насамперед синтез комплексу гідролітичних ферментів, до складу якого входять целюлази, геміцелюлази та інші позаклітинні ензими. Секреція ферментів у культуральне середовище відбувається переважно на пізніх експоненційних і стаціонарних фазах росту та має індукований характер. Важливою особливістю метаболізму є чутливість синтезу целюлаз до катаболітної репресії, що проявляється пригніченням ферментоутворення за наявності легко засвоюваних цукрів (Kamaluddeen, & Madika, 2023).

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно із загальноприйнятою таксономічною класифікацією, *Trichoderma viride* належить до царства *Fungi*, відділу *Ascomycota*, класу *Sordariomycetes*, порядку *Hypocreales*, родини *Hypocreaceae*, роду *Trichoderma*. Представники

цього роду характеризуються анаморфною стадією розвитку та утворенням конідій, тоді як статева стадія (телеоморфа) в багатьох випадках пов'язується з родом *Hypocrea*. У сучасній систематиці, відповідно до принципу «one fungus — one name», використовується назва *Trichoderma* незалежно від наявності або відсутності статевої стадії (<https://www.first-nature.com/fungi/trichoderma-viride.php>, <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=100561>).

Таксономічний статус *T. viride* зазнавав уточнень у зв'язку з розвитком молекулярно-генетичних методів ідентифікації. Традиційно цей вид визначали на основі морфологічних і культуральних ознак, зокрема характеру галуження конідієносців, форми та забарвлення конідій і швидкості росту колоній. Однак сучасні дослідження показали, що під назвою *T. viride* тривалий час об'єднувалася група морфологічно подібних, але генетично відмінних таксонів. У зв'язку з цим у практиці сучасної мікології дедалі більшого значення набувають молекулярні маркери, зокрема аналіз послідовностей ITS-регіонів рДНК, генів *tef1* та *rpb2*, які дозволяють здійснювати точну видову ідентифікацію штамів (Lieckfeldt, Samuels, Nirenberg, & Petrini, 1999).

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Цільовим продуктом у даній роботі є целюлазний ферментний препарат, отриманий у результаті культивування штамів *T. viride*. Целюлази являють собою комплекс позаклітинних гідролітичних ферментів, що каталізують розщеплення целюлози — основного структурного компонента клітинних стінок рослин — до розчинних оліго- та моносахаридів. Завдяки здатності ефективно перетворювати складні полісахариди на доступні для подальшої біоконверсії сполуки, целюлази посідають важливе місце серед промислових ферментів біотехнологічного призначення (Kumar, & Maravi, 2021).

Практичне застосування целюлазних ферментних препаратів зумовлене їх здатністю забезпечувати контрольований гідроліз целюлозовмісної сировини в умовах, що є м'якшими та екологічно безпечнішими порівняно з хімічними методами. У промисловості целюлази використовують у процесах переробки рослинної біомаси з метою одержання ферментованих цукрів, які надалі можуть слугувати сировиною для біосинтезу палива, органічних кислот та інших біопродуктів. У целюлозно-паперовій і текстильній промисловості застосування целюлаз дає змогу модифікувати волокнисті матеріали, покращувати фізико-механічні властивості продукції та зменшувати споживання агресивних хімічних реагентів. У харчовій і кормовій галузях целюлазні препарати використовують для підвищення біодоступності поживних компонентів рослинної сировини, що сприяє інтенсифікації технологічних процесів і підвищенню їх ефективності (Kumar, & Maravi, 2021).

У харчовій промисловості целюлазні ферментні препарати застосовують для інтенсифікації технологічних процесів, пов'язаних із переробкою рослинної сировини. Целюлази використовують під час виробництва фруктових і овочевих

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</i>					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Балацький М.О.			РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ					
Перевір.		Резніченко Ю.М.						Літ.	Арк.	Аркушів
Реценз.									20	66
Н. Контр.								<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.		Стабніков В.П.								

соків з метою руйнування клітинних стінок рослинних тканин, що сприяє підвищенню виходу соку, зменшенню його в'язкості та покращенню фільтраційних властивостей. Крім того, застосування целюлаз у комплексі з іншими гідролітичними ферментами дозволяє підвищити прозорість напоїв і стабільність готової продукції (Rodrigues, & Odaneth, 2021).

Целюлази доцільно застосовують переважно під час виробництва соків із плодів, ягід і овочів з високим вмістом клітковини, де руйнування клітинних стінок сприяє підвищенню виходу соку та покращенню його технологічних властивостей. Для соків із сировини з низьким вмістом целюлози або для відновлених соків із концентратів застосування целюлаз є обмеженим або недоцільним (Ejaz, Sohail, & Ghanemi, 2021).

За даними Державної служби статистики та узагальненими у спеціалізованих оглядах, виробництво соків в Україні у 2023 р. становило близько 411,6 млн л (<https://doi.org/10.32702/2306-6792.2025.12.79>). Врахуємо, що деякі соки, наприклад цитрусові, не потребують обробки целюлазами. Оскільки така статистика відсутня, припускаємо, що їх частка становить лише 2,5%. Тоді кількість оброблюваного соку становитиме:

$$411\,600\,000 \times 0,975 = 401\,310\,000 \text{ л}$$

На 1 л соку додають 100-300 Од целюлази. Фермент додають в процесі освітлення соку (Shamala et al., 2003). Варто врахувати, що після обробки целюлазами утворюються тверді домішки, які згодом видаляються (Ribeiro, Henrique, Oliveira, Macedo, & Fleuri, 2010). В літературі не описаний точний відсоток об'єму, який припадає на ці домішки, тому припустимо, що їх близько 5%. Тоді, загальний об'єм необробленого соку становить:

$$\frac{401\,310\,000}{(1 - 0,05)} \approx 422\,431\,579 \text{ л}$$

Для визначення потреби в целюлазі беремо 200 Од/л як усереднене значення. Тоді, необхідна кількість одиниць ферменту на рік становить:

$$422\,431\,579 \times 200 = 84\,486\,315\,800 \text{ Од целюлази}$$

В табл.3.1. показано узагальнені дані щодо потреби в целюлазі.

Потреба в целюлазі для виробництва соків

Цільовий продукт	Об'єм готового соку, л	Об'єм необробленого соку, л	Кількість целюлази обробки	Од для
Целюлаза	401 310 000	422 431 579	84 486 315 800	

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На ринку України целюлаза здебільшого представлена під торговою маркою «Ензим» (<https://enzim.shop/tsejulaza.html>). Через те, що «Ензим» можна вважати монополістом в цій сфері, пропонується забезпечувати 30% від загальної потреби, з врахуванням того, що головний конкурент випускає цей фермент не лише для обробки сокової продукції. Тоді, потребу, що будемо забезпечувати, становитиме:

$$84\,486\,315\,800 \times 0,3 = 25\,345\,894\,740 \text{ Од целюлази}$$

Обраний біологічний агент *T. viride* Му синтезує 607,35 Од/мл целюлази (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018). Тоді, об'єм культуральної рідини на рік становить:

$$\frac{25\,345\,894\,740}{607,35} = 41\,731\,942 \text{ мл} \approx 41,73 \text{ м}^3$$

З врахуванням втрат при виділенні та очищенні ферменту, що приблизно становитиме 30%, кількість культуральної рідини на рік становитиме:

$$\frac{41,73}{(1 - 0,3)} \approx 59,6 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення річної потреби у целюлазі (згідно п.3.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 59,6 м³ культуральної рідини (V_{кр}).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів (T_{тр}) – 60, тоді об'єм культуральної рідини за добу (V_д) становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{тр}} = 59,6/60 \approx 1 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 1 \times 128,5) / 24 = 5,89 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу ($T_{\text{к}} = 120$ год) та час підготовки ферментера до роботи ($T_{\text{пр}} = 8,5$ год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера ($T_{\text{пр}}$) включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Визначивши об'єм культуральної рідини за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_s , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{ГФ}} = V_{\text{цк}} / K_s = 5,89 / 0,6 = 9,82 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{\text{ГФ}} = 10 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез целюлази здійснюють у ферментері геометричним об'ємом ($V_{\text{ГФ}}$) 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення (K_s) $0,6$.

Робочий об'єм ферментера ($V_{\text{РОБ}}$) становить:

$$V_{\text{РОБ}} = V_{\text{ГФ}} \times K_s = 10 \times 0,6 = 6 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 6 м^3 культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{РОБ.1}} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування в посівному апараті об'ємом:

$$V_{\text{ПА1}} = V_{\text{РОБ.1}} / K_s = 0,6 / 0,6 = 1 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{РОБ.2}} = 0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 = 60 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{\text{ИИ2}} = V_{\text{РОБ.2}} / K_S = 60 / 0,6 = 100 \text{ л.}$$

Для одержання 60 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{РОБ.3}} = 60 \times 0,1 = 6 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{\text{ИИ3}} = V_{\text{РОБ.3}} / K_S = 6 / 0,6 = 10 \text{ л.}$$

Для отримання 6 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{РОБ.4}} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ л (600 мл) посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту отримують культивуванням у колбах на качалці.

Для цього використовують колби об'ємом 750 мл з 150 мл середовища в кожній.

Тобто, потрібно буде 4 колби.

Висновки щодо кількості стадій підготовки посівного матеріалу, об'ємів ферментаційного обладнання і об'ємів води для підготовки поживного середовища на всіх етапах процесу наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, м ³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера (об'єм середовища) м ³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³	Конденсат (10%), м ³	Об'єм води для приготування композицій середовища, м ³
10	0,6	6	0,6	0,6	4,8
1	0,6	0,6	0,06	0,06	0,48
0,1	0,6	0,06 (60 л)	0,006 (6 л)	0,006 (6 л)	0,048 (48 л)
0,01 (10 л)	0,6	0,006 (6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0048 (4,8 л)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для промислового виробництва целюлази штами *T. viride* зазвичай культивують глибинним методом у рідкому поживному середовищі. Порівняно з твердофазним способом культивування, глибинний метод забезпечує більш однорідну суспензію клітин, ефективний масо- та теплообмін, можливість точного контролю концентрації розчиненого кисню та рН, що безпосередньо впливає на продуктивність ферменту. твердофазне культивування (SSF — solid state fermentation) хоч і може підвищувати специфічну активність ферменту на одиницю біомаси, проте у промисловому масштабі супроводжується складною системою зволоження, обмеженою можливістю контролю температури і кисню, а також підвищеним ризиком забруднення мікрофлорою, що робить його менш придатним для стабільного виробництва целюлази (Kamaluddeen, & Madika, 2023).

Оптимальна температура культивування *T. viride* становить 25–30 °С, що відповідає її мезофільним властивостям і забезпечує максимальний рівень росту міцелію та секреції ферментів. Вихід ферменту значно знижується при температурах нижче 20 °С (уповільнення росту) або вище 35 °С (денатурація ферментів та пригнічення метаболізму) (Singh et al., 2014).

Аерація і перемішування є критично важливими для глибинних культур, оскільки міцелій *Trichoderma* характеризується високою потребою в кисні для синтезу позаклітинної целюлази. Вертикальні мішалкові біореактори з примусовою аерацією через барботажну систему забезпечують рівномірний розподіл кисню, підтримання однорідності середовища і запобігають локальному перенасиченню клітин киснем чи утворенню осаду. Для підтримки аерації часто застосовують повітряно-поверхневу аерацію з регулюванням

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Балацький М.О.				РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Резніченко Ю.М.						26	66
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

витрати повітря, що дозволяє оптимізувати продуктивність ферменту (Patel, Choy, Malouf, & Thibault, 2009).

Асептичність процесу є обов'язковою для глибинного культивування, оскільки стороння мікрофлора може пригнічувати ріст *T. viride* та знижувати кінцевий вихід целюлази. Використання стерильних ферментерів, стерильного середовища і контрольованих умов введення інокуляту дозволяє уникнути контамінації.

Що стосується режиму культивування, промислові процеси часто застосовують періодичний (batch) або напівбезперервний (fed-batch) метод, який дозволяє оптимізувати концентрація ферменту. Періодичне культивування забезпечує контроль над концентрацією субстрату, запобігає утворенню метаболічних інгібіторів та дозволяє планувати час збору ферменту у фазі максимальної продуктивності. На відміну від безперервного культивування, де складніше підтримувати асептичність і стабільні параметри росту, періодичний режим є більш надійним для отримання стабільного продукту високої активності у промислових масштабах.

Оптимальний спосіб культивування для промислового виробництва целюлази штамами *T. viride* — це глибинний метод у вертикальному мішалковому ферментері з контрольованою температурою 25–30 °С, примусовою аерацією, дотриманням асептичності та періодичним режимом внесення субстрату і збору ферменту, що забезпечує максимальну продуктивність і стабільність технологічного процесу.

Вибір конструкції ферментера при культивуванні *T. viride* критично впливає на масообмін кисню, однорідність середовища, стабільність умов культивування і кінцеву продуктивність целюлаз. Основними конструктивними варіантами є ферментери з механічним перемішуванням (турбінна мішалка) та з газовою циркуляцією (аерліфт).

Конструкції з механічною мішалкою забезпечують активне перемішування рідини та високу інтенсивність масообміну завдяки роботі вінцевих чи турбінних лопатей, що особливо важливо для культури філаментозних грибів, які

формують в'язку суспензію. Такий тип біореактора дозволяє ефективно диспергувати культуру, підтримувати однорідний розподіл поживних речовин і кисню по всьому об'єму, а також забезпечує можливість зовнішнього точного контролю швидкості обертання мішалки та аерації, що сприяє стабільному росту і високому виходу ферментів. Ферментери з турбінними або лопатевими мішалками є універсальними для процесів з високим вмістом біомаси і потребою в інтенсивній аерації, тому вони широко застосовуються в промислових біотехнологічних процесах.

На відміну від механічного перемішування, аерліфтні біореактори (airlift) використовують циркуляцію газової фази як основний засіб масообміну. Газові бульбашки, подані в нижню частину реактора, створюють підйомний струмінь (ліфт), що переміщує культури у вертикальних контурах. Така конструкція має меншу кількість рухомих частин, нижчу енергоємність та знижений ризик механічного пошкодження міцелію порівняно з турбінними мішалками, але втрачає в інтенсивності масообміну й гнучкості контролю за складними культурами з високою в'язкістю середовища.

Для культивування *T. viride*, яка характеризується формуванням філаментозного міцелію та відчутною в'язкістю культуральної рідини, ферментер із механічним перемішуванням (турбінна або лопатева мішалка) є більш придатним. Такий режим дозволяє зменшити утворення градієнтів кисню та субстрату, підвищити однорідність суспензії та мінімізувати скуповування міцелію біля стінок, що сприяє стабільній ферментації та високому виходу цільового продукту.

Для масштабного рідинного культивування *T. viride* з метою цільового синтезу целюлаз доцільно застосовувати промисловий ферментер зі сталевим корпусом і механічним перемішуванням, наприклад Labzee Stainless Steel Bioreactor BZLB-515. Цей біореактор має робочий об'єм 10 000 л, що відповідає вимогам серйозних біотехнологічних процесів і дозволяє реалізовувати як періодичні, так і безперервні (continuous) або поступово підживлювані (fed-batch) режими культивування (<https://www.labzee.com/stainless-steel->

[bioreactor/bzlb-](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)

[515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)).

Конструкція ферментера виконана з нержавіючої сталі промислового класу, що забезпечує високу корозійну стійкість, асептичність та тривалий термін експлуатації, а також дозволяє інтегрувати систему sterilize-in-place (SIP) і clean-in-place (CIP) для підтримки стерильних умов під час циклів ферментації

([https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)

[515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)).

Механічне перемішування здійснюється через турбінну мішалку з верхнім приводом (top-drive), що дозволяє регулювати швидкість обертання в широкому діапазоні від 50 до 1000 об/хв, і забезпечує ефективний масообмін кисню й однорідність середовища по всьому об'єму. Такий тип перемішування є оптимальним для аеробних філаментозних культур — зокрема грибів, подібних до *Trichoderma viride*, що формують в'язкі суспензії

([https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)

[515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)).

Біореактор обладнаний розвиненою системою автоматичного контролю технологічних параметрів: датчиками рН, розчиненого кисню (DO), температури, піноутворення (foam), що працюють у тандемі з контролером та SCADA-інтеграцією для повної автоматизації процесу. Наявність широкого діапазону вимірювання рН (2,00–12,00 ±0,1) та DO (0–150 % ±3 %) забезпечує гнучкість підтримки оптимальних умов для росту культури та продукції ферменту

([https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)

[515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1](https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsltid=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1)).

Габаритні розміри ферментера складають $\approx 470 \text{ см} \times 320 \text{ см} \times 500 \text{ см}$ (ширина \times глибина \times висота), а маса без навантаження — близько 3900 кг, що

характерно для великотоварних виробничих систем із автоматизованим управлінням і дистанційним контролем параметрів (https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsId=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1).

Застосування такого ферментера забезпечує необхідну технологічну платформу для стабільного культивування *T. viride*, підтримання оптимальної аерації, температури та однорідної суспензії, що є критичними факторами для максимальної продуктивності целюлаз у глибинному режимі (https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsId=AfmBOoqgb2qYFId4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1).

Ключові технічні параметри BZLB-515

Об'єм: 10 000 л (10 м³) — відповідає масштабу промислового виробництва.

Тип перемішування: механічна турбінна мішалка із верхнім приводом.

Діапазон швидкості мішалки: 50–1000 об/хв — забезпечує гнучкий контроль масообміну.

Контроль параметрів: рН, DO, температура, піноутворення.

Габарити (W×D×H): 470 см × 320 см × 500 см.

Матеріал: нержавіюча сталь для асептичних процесів.

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Біосинтез целюлаз у культурах *T. viride* відбувається в аеробних умовах і супроводжується інтенсивним споживанням розчиненого кисню. Це пояснюється високою метаболічною активністю грибних культур, а також специфікою ферменту целюлази, функціонування якого потребує перенесення електронів на молекулярний кисень. У зв'язку з цим підготовка аераційного повітря є критичною стадією процесу, що впливає на стабільність культивування, рівень ферментативної активності та відтворюваність результатів.

Першим етапом підготовки повітря є його очищення від механічних домішок та мікроорганізмів. Незважаючи на те, що *T. viride* є досить стійкою культурою, контамінація спороутворюючими бактеріями або іншими грибами може призвести до конкуренції за субстрат, зниження виходу целюлаз та порушення стерильності процесу. Тому доцільним є використання багатоступеневої системи фільтрації, що включає грубі та тонкі фільтри, а також стерилізувальні мембранні фільтри з порами 0,22–0,3 мкм.

Другим важливим фактором є регулювання температури та вологості аераційного повітря. Подача надто сухого повітря сприяє випаровуванню середовища, зміні концентрацій поживних речовин та підвищенню піноутворення, що негативно впливає на продуктивність ферментації. Тому повітря звожують до параметрів, близьких до насичення за робочої температури, та попередньо підігрівають до 35–40 °С, щоб зменшити теплові втрати ферментера і підтримувати стабільний температурний режим.

Процес підготовки аераційного повітря включає такі основні етапи:

1. Забір повітря

Повітря відбирають через трубопровід, розташований на висоті 10–15 м над рівнем землі, де вміст пилу та мікроорганізмів мінімальний. Вхідний отвір оснащують захисними сітками для запобігання потраплянню великих часток.

2. Попередня очистка

Видалення грубодисперсних часток (>5–10 мкм) здійснюють через масляні або рукавні фільтри, що також захищає компресорне обладнання.

3. Стиснення повітря

Очищене повітря стискають компресором до надлишкового тиску 0,3–0,5 МПа, необхідного для подачі у ферментер. Під час стиснення температура повітря підвищується, що дозволяє частково стерилізувати його та зменшити вологість.

4. Охолодження та видалення вологи

Стиснене повітря охолоджують у теплообмінниках до робочої температури ($\approx 25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$), при цьому конденсована волога та залишки мастила відводяться через вологомасловідокремлювачі.

5. Нагрівання перед тонкою очисткою

Перед проходженням через фільтри повітря підігрівають до $30\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$, що сприяє підтриманню оптимальної вологості та запобігає зволоженню мембранних фільтрів.

6. Головна очистка та стерилізація

Повітря проходить через фільтр тонкої очистки та мембранний стерилізувальний фільтр з порами $0,22\text{ }\mu\text{m}$, що забезпечує надходження стерильного аераційного повітря до ферментера та інокуляторів.

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Середовище для підготовки інокуляту має наступний склад (г/л) (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018):

Al_2O_3 – 10 (додається у вигляді концентрованого розчину в цитратному буфері, pH 6,5)

СМС-На – 7,5

Пептон – 5,0

Tween-80 – 2 мл/л

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3

K_2HPO_4 – 2,0

CaCl_2 – 0,3

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,0016

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0014

CoCl_2 – 0,002

Тож, з врахуванням особливостей кожного компонента пропонується наступний поділ на композиції:

Композиція А: СМС-Na, пептон, Tween-80 при 120 °С, протягом 20 хвилин при 0,1 МПа.

Композиція Б: MgSO₄·7H₂O, CaCl₂, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, ZnSO₄·7H₂O та CoCl₂ при 131 °С, протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

Композиція В: K₂HPO₄ при 131 °С, протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

Композиція Г: Al₂O₃ при 131 °С, протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

Оксид алюмінію виокремлюємо через його специфіку приготування у буфері. Фосфатну сіль калію виокремлюємо для неможливості утворення осадів з катіонами кальцію та магнію. Інші компоненти менш стійкі до температури, тому в ходять в композицію А та стерилізуються при менш жорстких умовах.

Щодо виробничого середовища, передбачено наступний склад (г/л) (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018):

СМС-Na – 7,5

Tween-80 – 2 мл/л

MgSO₄·7H₂O – 0,3

(NH₄)₂SO₄ – 1,4

K₂HPO₄ – 2,0

CaCl₂ – 0,3

FeSO₄·7H₂O – 0,005

MnSO₄·H₂O – 0,0016

ZnSO₄·7H₂O – 0,0014

CoCl₂ – 0,002

Тож, поділ на композиції буде виконано по принципу, що був використаний для посівного середовища.

Композиція А: СМС-Na, та Tween-80 при 120 °С, протягом 20 хвилин при 0,1 МПа.

Композиція Б: MgSO₄·7H₂O, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, ZnSO₄·7H₂O та CoCl₂ при 131 °С, протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

Композиція В: K₂HPO₄ при 131 °С, протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

В дано випадку особливості передбачаються лише для фосфатної солі, яка утворює нерозчинні осаді з катіонами кальцію та магнію.

Проте, з врахуванням об'єму поживного середовища на цій стадії логічним є стерилізація в установці безперервної стерилізації.

4.3.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

В табл.4.1. показано розрахунок композицій для зазначеної стадії.

Таблиця 4.1.

Розрахунок об'єму композицій для стадії одержання інокуляту в колбах на качалці

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 0,54 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
СМС-Na	7,5	4,1	А	150
Пептон	5	2,7		
Tween-80	2	1,1		
Вода	150 мл			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	0,16	Б	150
CaCl ₂	0,3	0,16		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	0,003		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0016	0,001		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0014	0,002		
CoCl ₂	0,002	0,001		
Вода	150 мл		В	100
K ₂ HPO ₄	2	1,1		
Вода	100 мл			
Al ₂ O ₃	10	5,4	Г	140
Вода (цитратний буфер)	140 мл			
Всього				540

З табл.4.1. стає очевидним про потребу в приготуванні запасного розчину мікроелементів, оскільки вага FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, ZnSO₄·7H₂O та CoCl₂ визначається сотими грам. В табл.4.2. враховано наявність мікроелементів.

Таблиця 4.2.

Розрахунок об'єму композицій для стадії одержання інокуляту в колбах на качалці з врахуванням розчину мікроелементів

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 0,54 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
СМС-Na	7,5	4,1	А	150
Пептон	5	2,7		
Tween-80	2	1,1		
Вода	150 мл			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	0,16	Б	140
CaCl ₂	0,3	0,16		
Вода	140 мл			
Розчин мікроелементів	10 мл		-	10
K ₂ HPO ₄	2	1,1	В	100
Вода	100 мл			
Al ₂ O ₃	10	5,4	Г	140
Вода (цитратний буфер)	140 мл			
Всього				540

Тож, для приготування та стерилізації композиції А, Б та Г потрібно передбачити колбу на 0,5 л, а для композиції В – колбу на 0,25 л.

5.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

В табл.4.3. показано розрахунок об'ємів композицій для стадій вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.

Таблиця 4.3.

Розрахунок об'єму композицій для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 5,4 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
СМС-Na	7,5	40,5	А	500
Пептон	5	27		
Tween-80	2	10,8		
Вода	500 мл			

Закінчення табл.4.3.

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	1,62	Б	500
CaCl ₂	0,3	1,62		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	0,03		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0016	0,01		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0014	0,02		
CoCl ₂	0,002	0,01		
Вода	500 мл		В	400
K ₂ HPO ₄	2	10,8		
Вода	400 мл			
Al ₂ O ₃	10	54	Г	4000
Вода (цитратний буфер)	3650 мл			
Конденсат	≈350 мл			
			Всього	5400

Тож, для приготування та стерилізації композиції А, Б та В потрібно передбачити колбу на 1 л, а для композиції Г – реактор-змішувач об'ємом 5 л, в якому композиція буде готуватись та інокулятор об'ємом 10 л, в якому сіль буде стерилізуватись.

В табл.4.4. показано розрахунок об'ємів композицій для стадій вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л.

Таблиця 4.4.

Розрахунок об'єму композицій для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 54 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
СМС-Na	7,5	405	А	4
Пептон	5	270		
Tween-80	2	108		
Вода	3,65 л			
Конденсат	≈0,35 л			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	16,2		
CaCl ₂	0,3	16,2		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	0,27		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0016	0,09		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0014	0,08		
CoCl ₂	0,002	0,11		
Вода	3,65 л			
Конденсат	≈0,35 л			

Закінчення табл.4.4.

K ₂ HPO ₄	2	108	В	4
Вода	3,65 л			
Конденсат	≈0,35 л			
Al ₂ O ₃	10	540	Г	38
Вода (цитратний буфер)	38,2 л			
Конденсат	≈3,8 л			
Всього				54

Тож, для приготування та стерилізації композиції А, Б та В потрібно передбачити реактор-стерилізатор на 5 л, а для композиції Г – реактор-змішувач об'ємом 50 л, в якому композиція буде готуватись та інокулятор об'ємом 100 л, в якому сіль буде стерилізуватись.

В табл.4.5. показано розрахунок об'ємів композицій для стадій вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³.

Таблиця 4.5.

Розрахунок об'єму композицій для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 540 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
СМС-Na	7,5	4050	А	40
Пептон	5	2700		
Tween-80	2	1080		
Вода	36,5 л			
Конденсат	≈3,5 л			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	162	Б	40
CaCl ₂	0,3	162		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	2,7		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0016	0,86		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0014	0,76		
CoCl ₂	0,002	1,08		
Вода	36,5 л			
Конденсат	≈3,5 л			
K ₂ HPO ₄	2	1080	В	40
Вода	36,5 л			
Конденсат	≈3,5 л			
Al ₂ O ₃	10	5400	Г	380
Вода (цитратний буфер)	382 л			
Конденсат	≈38 л			
Всього				540

Тож, для приготування та стерилізації композиції А, Б та В потрібно передбачити реактор-стерилізатор на 50 л, а для композиції Г – реактор-змішувач об'ємом 500 л, в якому композиція буде готуватись та інокулятор об'ємом 1000 л, в якому сіль буде стерилізуватись.

4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

В табл.4.6. показано розрахунок об'ємів композицій для стадій виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³.

Таблиця 4.6.

Розрахунок об'єму композицій для стадії виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 5400 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
СМС-Na	7,5	40,50	-	5400
Tween-80	2	10,80		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	1,62		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	7,56		
CaCl ₂	0,3	1,62		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	2,7		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0016	0,01		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0014	0,01		
CoCl ₂	0,002	0,01		
K ₂ HPO ₄	2	10,8		
Вода	4500 л			
Конденсат	900 л			
Всього				

Тож, середовище для виробничого біосинтезу буде стерилізуватись в установці безперервної стерилізації об'ємом 5 м³ (УБС-5).

Щодо титрувальних агентів, в основній статті не передбачено контроль рН на відповідному рівні. Стосовно піногасника, його застосування є недоцільним через відсутність піноутворювальних компонентів у виробничому середовищі, невелику присутність (в низькій концентрації) в посівному середовищі, а також наявності Твін-80, який частково відіграє роль піногаснику.

РОЗДІЛ 5
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання допоміжних робіт та виробничого біосинтезу для одержання целюлази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
P-1 P-4 P-6 P-8	Реактор об'ємом 5 л	4	Реактор об'ємом 5 л 412Т1300. Виконаний зі сталі нержавіючої 1.4980. Має мішалку та сорочку. Є можливість оснастити додатковими датчиками контролю рН, рівня і т.д. Габарити (мм): 700x600x1700 ¹
D-2 D-5 D-7 D-9 D-11 D-16 D-19 D-22 D-26 D-32	Об'ємно-ваговий дозатор	10	Рідинний дозатор DELTAMATIC. Діапазон вимірів: 0,1-999,9 л. Похибка вимірювання: 1%. Габарити (мм): 270x190x295 ²
I-3	Інокулятор об'ємом 10 л	1	Інокулятор Biostat® Cplus 10L. Об'єм 10 л. Виконаний зі сталі нержавіючої. Оснащений турбінною мішалкою. Датчики контролю кисню, рН, перемішування і т.д. Має сорочку. Габарити (мм): 1000x1900x750 ³

<i>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	
<i>Розроб.</i>	<i>Балацький М.О.</i>				
<i>Перевір.</i>	<i>Резніченко Ю.М.</i>				
<i>Реценз.</i>					
<i>Н. Контр.</i>					
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>				
РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
				39	66
<i>Кафедра БТМ</i>					

Продовження табл.5.1.

P-10 P-15 P-18 P-21	Реактор об'ємом 50 л	4	Реактор об'ємом 50 л FE50. Виконаний зі сталі нержавіючої. Має мішалку та сорочку. Є можливість оснащити додатковими датчиками контролю рН, рівня і т.д. Габарити (мм): 1000x1500x1800 ⁴
H-12 H-17 H-20 H-23	Насос перистальтичний	4	Перистальтичний насос Kors LP150. Продуктивність до 150 л/год ⁵
I-13	Інокулятор об'ємом 100 л	1	Інокулятор BR500-C1. Об'єм 100 л. Виконаний зі сталі нержавіючої. Оснащений турбінною мішалкою. Датчики контролю кисню, рН, перемішування і т.д. Має сорочку. Габарити (мм): 650x650x1492 ⁶
D-14 D-24 D-29	Ваговий дозатор	3	Ваговий дозатор сипких продуктів ВЛД-1К. продуктивність до 600 доз/год. Дозування до 40 кг ⁷
P-25	Реактор об'ємом 500 л	1	Реактор об'ємом 500 л 400X1189. Виконаний зі сталі нержавіючої. Має мішалку та сорочку. Є можливість оснащити додатковими датчиками контролю рН, рівня і т.д. Габарити (мм): 1400x1000x2400 ⁸
H-27	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий M-94-N PL. Продуктивність 3 м ³ /год ⁹
I-28	Інокулятор об'ємом 1000 л	1	Інокулятор Mobius® 1000 L Bioreactor. Об'єм 1000 л. Виконаний зі сталі нержавіючої. Оснащений турбінною мішалкою. Датчики контролю кисню, рН, перемішування і т.д. Має сорочку. Габарити (мм): 3100x1950x1650 ¹⁰
P-30	Реактор об'ємом 10 м ³	1	Реактор об'ємом 1000 л 245P288. Виконаний зі сталі нержавіючої. Має мішалку та сорочку. Є можливість оснащити додатковими датчиками контролю рН, рівня і т.д. Габарити (мм): 3000x3000x6000 ¹¹

Закінчення табл.5.1.

Д-31	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор для густих рідин Hualian NPP-5000. Діапазон дозування: 500 – 5000 мл. Продуктивність: 10 - 18 разів/хв. Похибка дози (припустима): до 1%. Габарити (мм): 880x250x770 ¹²
Н-33 Н-36	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий Ebara 3D/I 32-160/1.5. Продуктивність до 20 м ³ /год ¹³
УБС-34	Установка безперервної стерилізації 5 м ³	1	УБС LXM-5. Продуктивність до 5 м ³ /год. Габарити (мм): 2500×1500×2000 ¹⁴
Ф-35	Ферментер об'ємом 10 м ³	1	Ферментер BZLB-515. Об'єм 10000 л. Виконаний зі сталі нержавіючої. Оснащений турбінною мішалкою. Датчики контролю кисню, рН, перемішування і т.д. Має сорочку. Габарити (мм): 4700×3200×5000 ¹⁵

Примітка: 1 - <https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/medimex-hlr-5-5-ltr-stainless-steel-reactor-412t1300/>, 2 - https://prom.ua/ua/p1302072814-dozator-vody-deltamatik.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_152304_15_aksessuary_dlya_kuhni_5330921877&gad_source=1&gad_campaignid=22973178888&g_braid=0AAAAADBxJSX5kyPMB2KhJ-Ny2XUbsMzq&gclid=CjwKCAiAjojLBhAlEiwAcjhrDsj-iBalZmF9zxiXCsz0av48-iY-CNMII2IdH3km5DWQovYQc1VoFxoC_BUQAvD_BwE, 3 - <https://www.sartorius.com/download/9612/10/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>, 4 - <https://liliequipment.en.made-in-china.com/product/nmWYCrMKXkhB/China-Premium-50-Liter-Stainless-Steel-316-Chemical-Lab-Reactor.html>, 5 - https://kors.in.ua/ua/p2471223905-peristalticheskij-nasos-kors.html?srsId=AfmBOor0-Z6IXO1MR1TEV_2Otjvt77Mgt0H06DrSvxDqpgC9L_nxDsPx, 6 - <https://files.lab1st.com/documents/BR500-C1-100L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>, 7 - https://prom.ua/ua/p953830992-vesovoj-dozator-sypuchih.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gad_campaignid=20983226771&g_braid=0AAAAADBxJSXs4K2bO1tjVvzu1FJhSboJp&gclid=CjwKCAiAjojLBhAlEiwAcjhrDg9eGc53NP1oc-tdT4G7DmFgivyO4KPKNQ9US-S2ES-xHYfg9gS0URoCqEYQAvD_BwE, 8 - <https://www.foeth.com/ru/reaktory/reaktory-iz-nerzhaveyushhej-stali/gross-bioreactor-500-l-reaktor-iz-nerzhavejuschej-stali-400x1189/>, 9 - <https://farmershop.com.ua/uk/nasos-vidtsentrovij-m-94-n-pl-nerzh-037-kvt-saer-3-m3god-39-m-3503-000035361>, 10 - <https://www.merckmillipore.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/480/100/sp1237en-mk.pdf>, 11 - <https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/asca-10000-ltr-stainless-steel-reactor-245p288/>, 12 - <https://www.kiy-v.ua/ua/dozator-dlja-gustyh-zhidkостей-hualian-npp-5000.html>, 13 - <https://profportal.com.ua/ru/nasosy/centrobezhnye-nasosy/centrobezhnyj-nasos-24-m-ch-28m-foras-mn32-160b>, 14 - <http://sdlcentrifuge.com/9-continuous-sterilization-system/192767/>, 15 - https://www.labzee.com/stainless-steel-bioreactor/bzlb-515?srsId=AfmBOoqgb2qYFI4y7M9WSx_pEfusieMR4Dp20Mn30q165Gm1B8g2sA1

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря відбирають через вертикальну трубу з повітрязабірним пристроєм, встановленим на висоті 15 м над землею, що дозволяє зменшити кількість пилу та мікроорганізмів у повітрі.

ДР 1.2. Попереднє очищення від грубодисперсних домішок

Повітря з попереднього етапу пропускають через фільтр попереднього очищення, який затримує механічні частки пилу діаметром $\delta > 50$ мкм. Ефективність цього очищення досягає 90%, що значно знижує рівень забруднення та частково видаляє мікроорганізми, адсорбовані на пилових частках.

ДР 1.3. Стискання повітря

Очищене повітря подають у компресор, де його стискають до тиску 0,35–0,5 МПа. При цьому температура повітря підвищується до 120–200 °С, а вміст вологи на одиницю об'єму збільшується.

ДР 1.4. Охолодження та видалення надлишкової вологи

Стиснене повітря проходить через теплообмінник-охолоджувач, де його охолоджують до 25–40 °С за допомогою охолодженої води. Конденсована волога збирається в ресивері, і відносна вологість повітря знижується до 60–70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Після охолодження повітря підігрівають у теплообміннику-нагрівачі за допомогою пари низького тиску до 60–65 °С, що дозволяє зменшити відносну вологість до приблизно 50%.

ДР 1.6. Головне очищення повітря

Нагріте повітря подають у головний фільтр тонкого очищення,

					НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Балацький М.О.</i>			РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					42	66
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

розташований поблизу ферментаційних відділень, де ступінь очищення досягає близько 95%.

ДР 1.7. Кінцеве очищення в індивідуальних фільтрах

Після головного фільтра повітря пропускають через індивідуальні стерилізувальні фільтри для кожного інокулятора та ферментера, після чого воно надходить до відповідних технологічних пунктів (ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 4.7, ТП 5.1). Ступінь остаточного очищення становить 99,999%.

ДР 2. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів

На технічних вагах зважують 0,03 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,02 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,01 г CoCl_2 . Наважки солей вносять в конічну скляну колбу об'ємом 250 мл. Після цього, мірним циліндром доливають 100 мл води питної. Солі розмішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в колбах на качалках

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 4,1 г СМС-На та 2,7 г пептону. Сипкі наважки пересипають в скляну конічну колбу об'ємом 500 мл. За допомогою скляної піпетки на 2 мл відбирають 1,1 мл Tween-80, який також переносять до колби. Далі, за допомогою мірного циліндру відміряють 150 мл води питної і також вносять в колбу. Компоненти перемішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 120 °С протягом 20 хвилин при 0,1 МПа.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують по 0,16 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та CaCl_2 . Наважки солей вносять в конічну скляну колбу об'ємом 500 мл. Після цього, мірним циліндром доливають 140 мл води питної. Солі розмішують до повного

розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,1 г K_2HPO_4 . Наважку солі вносять в конічну скляну колбу об'ємом 250 мл. Після цього, мірним циліндром доливають 100 мл води питної. Сіль розмішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

ДР 3.1.4.1. Приготування 100 мМ цитратного буфера

На технічних вагах зважують 5,14 г дигідрату цитрату натрію та 0,48 г лимонної кислоти. Наважки переносять в скляний мірний стакан об'ємом 250 л. За допомогою мірного циліндру доливають 200 мл води питної. Вкидають магнітик та ставлять майбутній буфер на магнітну мішалку, паралельно вимірюючи рН розчину. Він має становити 6,5. За потреби розчин підтитрують концентрованими розчинами гідроксиду натрію або соляної кислоти (в концентраціях 10%).

ДР 3.1.4.2. Додавання оксиду алюмінію та стерилізація композиції

На технічних вагах зважують 5,4 г Al_2O_3 . Наважку оксиду алюмінію вносять в конічну скляну колбу об'ємом 500 мл. Після цього, мірним циліндром доливають 140 мл буфери від ДР 3.1.4.1. Оксид алюмінію розмішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 41 г СМС-На та 27 г пептону. Сипкі наважки пересипають в скляну конічну колбу об'ємом 1 л. За допомогою мірного циліндру відміряють 10,8 мл Tween-80, який також переносять до колби. Далі, за допомогою мірного циліндру відміряють 500 мл води питної і також вносять в

колбу. Компоненти перемішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 120 °С протягом 20 хвилин при 0,1 МПа.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують по 1,62 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та $CaCl_2$, 0,03 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 г $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,02 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ та 0,01 г $CoCl_2$. Наважки солей вносять в конічну скляну колбу об'ємом 1 л. Після цього, мірним циліндром доливають 500 мл води питної. Солі розмішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 10,8 г K_2HPO_4 . Наважку солі вносять в конічну скляну колбу об'ємом 1 л. Після цього, мірним циліндром доливають 400 мл води питної. Сіль розмішують до повного розчинення. Колбу після цього закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г

ДР 3.2.4.1. Приготування 100 мМ цитратного буфера

На технічних вагах зважують 93,82 г дигідрату цитрату натрію та 8,84 г лимонної кислоти. Наважки переносять в реактор (Р-1) об'ємом 5 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-2) доливають 3,65 л води питної. Вмикають мішалку та постійно контролюють датчик контролю рівня рН. Він має становити 6,5. За потреби розчин підтитрують концентрованими розчинами гідроксиду натрію або соляної кислоти (в концентраціях 10%).

ДР 3.2.4.2. Додавання оксиду алюмінію та стерилізація композиції

На технічних вагах зважують 54 г Al_2O_3 . Наважку оксиду алюмінію вносять в реактор (Р-1), що вже містить готовий буфер. Вмикають мішалку для повного розчинення оксиду алюмінію. Далі, композиція самоплином подається до інокуляторв (І-3), в якому і буде стерилізуватись композиція. Композицію стерилізують при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 410 г СМС-На та 270 г пептону. Сипкі наважки пересипають в реактор (Р-4) об'ємом 5 л. За допомогою мірного циліндру відміряють 108 мл Tween-80, який також переносять до реактора (Р-4). Далі, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-5) доливають 3,65 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення компонентів. Кришку реактора закривають, а композиція всередині стерилізується при 120 °С протягом 20 хвилин при 0,1 МПа.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують по 16,2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та $CaCl_2$, 0,27 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,09 г $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,08 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ та 0,11 г $CoCl_2$. Наважки солей вносять в реактор (Р-6) об'ємом 5 л. Після цього, об'ємно-ваговим дозатором (Д-7) доливають 3,65 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення компонентів. Кришку реактора закривають, а композиція всередині стерилізується при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 108 г K_2HPO_4 . Наважку солі вносять в реактор (Р-8) об'ємом 5 л. Після цього, об'ємно-ваговим дозатором (Д-9) доливають 3,65 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення солі. Кришку реактора закривають, а композиція всередині стерилізується при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.3.4. Приготування та стерилізація композиції Г

ДР 3.3.4.1. Приготування 100 мМ цитратного буфера

На технічних вагах зважують 981,86 г дигідрату цитрату натрію та 92,5 г лимонної кислоти. Наважки переносять в реактор (Р-10) об'ємом 50 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-11) доливають 38,2 л води питної. Вмикають мішалку та постійно контролюють датчик контролю рівня рН. Він має

становити 6,5. За потреби розчин підтитрують концентрованими розчинами гідроксиду натрію або соляної кислоти (в концентраціях 10%).

ДР 3.3.4.2. Додавання оксиду алюмінію та стерилізація композиції

На технічних вагах зважують 540 г Al_2O_3 . Наважку оксиду алюмінію вносять в реактор (Р-10), що вже містить готовий буфер. Вмикають мішалку для повного розчинення оксиду алюмінію. Далі, композиція перистальтичним насосом (Н-12) подається до інокулятора (І-13), в якому і буде стерилізуватись композиція. Композицію стерилізують при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-14) зважують 4100 г СМС-На та 2700 г пептону. Сипкі наважки пересипають в реактор (Р-15) об'ємом 50 л. За допомогою мірного циліндру відміряють 1080 мл Tween-80, який також переносять до реактора (Р-15). Далі, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16) доливають 36,5 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення компонентів. Кришку реактора закривають, а композиція всередині стерилізується при 120 °С протягом 20 хвилин при 0,1 МПа.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують по 162 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ та $CaCl_2$, 2,7 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,86 г $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,76 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ та 1,08 г $CoCl_2$. Наважки солей вносять в реактор (Р-18) об'ємом 50 л. Після цього, об'ємно-ваговим дозатором (Д-19) доливають 36,5 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення компонентів. Кришку реактора закривають, а композиція всередині стерилізується при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1080 г K_2HPO_4 . Наважку солі вносять в реактор (Р-21) об'ємом 50 л. Після цього, об'ємно-ваговим дозатором (Д-22) доливають 36,5 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення солі.

Кришку реактора закривають, а композиція всередині стерилізується при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.4.4. Приготування та стерилізація композиції Г

ДР 3.4.4.1. Приготування 100 мМ цитратного буфера

На ваговому дозаторі (Д-24) зважують 9,82 кг дигідрату цитрату натрію та 0,93 кг лимонної кислоти. Наважки переносять в реактор (Р-25) об'ємом 500 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-26) доливають 382 л води питної. Вмикають мішалку та постійно контролюють датчик контролю рівня рН. Він має становити 6,5. За потреби розчин підтитрують концентрованими розчинами гідроксиду натрію або соляної кислоти (в концентраціях 10%).

ДР 3.4.4.2. Додавання оксиду алюмінію та стерилізація композиції

На ваговому дозаторі (Д-24) зважують 5,4 кг Al_2O_3 . Наважку оксиду алюмінію вносять в реактор (Р-25), що вже містить готовий буфер. Вмикають мішалку для повного розчинення оксиду алюмінію. Далі, композиція відцентровим насосом (Н-27) подається до інокулятора (І-28), в якому і буде стерилізуватись композиція. Композицію стерилізують при 131 °С протягом 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³

ДР 3.5.1. Змішування компонентів поживного середовища

На ваговому дозаторі (Д-29) зважують 40,5 кг СМС-На, 1,62 кг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 7,56 кг $(NH_4)_2SO_4$, 1,62 кг $CaCl_2$, 2,7 кг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 кг $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,01 кг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 кг $CoCl_2$, 10,8 кг K_2HPO_4 . Наважки переносять до реактора-змішувача об'ємом 10 м³ (Р-30). За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-31) вносять 10,8 л Tween-80. За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-32) вливають 4500 л води питної. Вмикається мішалка для повного розчинення компонентів. Далі, нестерильний розчин подається відцентровим насосом (Н-33) до установки безперервної стерилізації (УБС-34).

ДР 3.5.2. Стерилізація компонентів поживного середовища

Розчин потрапляє до установки безперервної стерилізації (УБС-34). Встановлюється режим стерилізації при 131 °С протягом 1 години 15 хвилин. Простерилізоване поживне середовище подається до ферментеру (Ф-35) за допомогою відцентрового насосу, що передбачено в конструкції УБС.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *T. viride* Му зберігають на скошеному картопляно-декстрозному агарі при 4°С. Пересів роблять кожні 1-3 місяці. Всі роботи з культурою виконують в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з картопляно-декстрозним агаром, розсівають голкою на чашки Петрі із картопляно-декстрозним агаром і вирощують при температурі 30 °С упродовж 6 діб.

ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках

Отримані ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають голкою в пробірки зі скошеним картопляно-декстрозним агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Тривалість вирощування – 6 діб. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 30 °С. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У стерильну колбу об'ємом 1 л зливають 150 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1), 140 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2), 100 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3) та 140 мл розчину композиції Г (від ДР 3.1.4.2). Семплером вносять 10 мл розчину мікроелементів (від ДР 2.1). Перемішують і розливають по 135 мл в 4 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *T. viride* Му, вирощеного на картопляно-декстрозному агарі, вносять 10 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним

середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалках. Умови культивування наступні: температура – 30 °С, частота обертання – 200 об/хв, час вирощування – 48 год. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора (І-3) на 10 л, що містить простерилізовану композицію Г (від ДР 3.2.4.2) в асептичних умовах вносять по 0,5 л композиції А (від ДР 3.2.1), композиції Б (від ДР 3.2.2) та 0,4 л композиції В (від ДР 3.2.3). В сорочку інокулятора подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 30 °С.

Посівний матеріал (від ТП 4.4) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря від ДР 1.7, а також відводяться відпрацьовані гази.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 100 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора (І-13) на 100 л, що містить простерилізовану композицію Г (від ДР 3.3.4.2) самоплином подається по 3,65 л композиції А (від ДР 3.3.1), композиції Б (від ДР 3.3.2) та композиції В (від ДР 3.3.3). В сорочку інокулятора подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 30 °С.

Посівний матеріал (від ТП 4.5) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази.

ТП 4.7. Вирощування посівного матеріалу в посівного апарату на 1 м³

До простерилізованого охолодженого інокулятора (І-28) на 1000 л, що містить простерилізовану композицію Г (від ДР 3.4.4.2) перистальтичними насосами (Н-17, Н-20, Н-23) подаються по 36,5 л композиції А (від ДР 3.4.1), композиції Б (від ДР 3.4.2) та композиції В (від ДР 3.4.3). В сорочку інокулятора подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 30 °С.

Посівний матеріал (від ТП 4.6) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез

До простерилізованого та охолодженого ферментеру (Ф-35) на 10 м³, потрапляє стерильне поживне середовище (від ДР 3.5.2). В сорочку ферментера подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 30 °С.

Посівний матеріал (від ТП 4.7) переносять у ферментер в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 120 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази.

Культивування ведуть до досягнення активності целюлази 607,35 Од/мл. Отриману культуральну рідину передають далі на отримання ферменту.

РОЗДІЛ 7

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦЕЛЮЛАЗИ

Після завершення процесу культивування культуральну суспензію, що містить пелетовану біомасу *T. viride* та розчинені позаклітинні целюлази, спрямовують на стадію відокремлення біомаси. Оскільки целюлази даного продуцента є переважно екзоферментами, їх виділення не потребує руйнування клітин, що суттєво спрощує технологічну схему процесу.

Відокремлення біомаси, представленої у вигляді щільних міцеліальних гранул, зазвичай здійснюють шляхом фільтрації. Гранульована форма росту гриба забезпечує ефективне та швидке розділення твердої та рідкої фаз, зменшуючи втрати об'єму культуральної рідини та ризик забруднення ферментного препарату внутрішньоклітинними компонентами (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018). Отриманий прозорий супернатант використовують як сирий ферментний препарат, що містить сумарну целюлазну активність.

З метою концентрування та часткового очищення целюлази сирий ферментний препарат піддають фракційному осадженню сульфатом амонію (Shyaula et al., 2023). Проте, з врахуванням об'єму, попередньо супернатант концентрують для подальшого заощадження реагентів на обробку. Оскільки целюлаза обраного біологічного агенту термостабільна, пропонується передбачити концентрування вакуум-випарюванням.

Далі, до охолодженого концентрату за умов постійного перемішування поступово додають кристалічний $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до ступеня насичення 80 %. Осадження проводять протягом 12–18 год при температурі 4 °С, що забезпечує збереження ферментативної активності та селективне осадження білкових фракцій, збагачених целюлазами (Shyaula et al., 2023).

Після завершення осадження білковий осад відокремлюють центрифугуванням (близько 10 000 об/хв, 15 хв, 4 °С), ресуспендують у

					НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Балацький М.О.				РОЗДІЛ 7 ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦЕЛЮЛАЗИ		
Перевір.	Резніченко Ю.М						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					Лім.	Арк.	Аркушів
						52	66
					Кафедра БТМ		

невеликому об'ємі 0,1 М фосфатного буфера з рН 6,0–7,0 та піддають діалізу. Діаліз здійснюють проти того самого буфера протягом 24 год при 4 °С з метою видалення іонів сульфату амонію та інших низькомолекулярних домішок (Shyaula et al., 2023).

З метою переведення целюлазного препарату у стабільну товарну форму частково очищений фермент після стадії концентрування піддають розпилювальному сушінню. Даний метод є технологічно доцільним для промислового виробництва ферментів грибного походження, оскільки забезпечує безперервність процесу, високу продуктивність та відносно низькі енерговитрати порівняно з ліофільним сушінням. Розпилювальне сушіння здійснюють шляхом диспергування рідкого ферментного концентрату у потоці нагрітого повітря, при цьому швидке випаровування вологи з дрібних крапель обмежує тривалість теплового впливу та дає змогу зберегти значну частину целюлазної активності (Shyaula et al., 2023).

Для запобігання термічній інактивації ферменту параметри сушіння підбирають з урахуванням термостабільності целюлаз *T. viride*; як правило, температура вхідного повітря становить 140–180 °С, а вихідного — 70–90 °С. У результаті отримують порошкоподібний ферментний препарат з низькою залишковою вологістю, зручний для дозування, транспортування та тривалого зберігання (Cruz et al., 2024).

Після стадії розпилювального сушіння целюлазний препарат піддають стандартизації з метою забезпечення стабільної та відтворюваної ферментативної активності у кожній партії готової продукції. Оскільки активність ферменту може варіювати залежно від умов культивування, ступеня очищення та режиму сушіння, сухий ферментний концентрат змішують з інертними наповнювачами до досягнення заданої активності, вираженої у відповідних ферментативних одиницях на одиницю маси препарату.

Як наповнювачі застосовують хімічно інертні, нетоксичні та сумісні з цільовою сферою використання матеріали, які не впливають на каталізаторні

отримати товарний ферментний препарат з прогнозованими технологічними

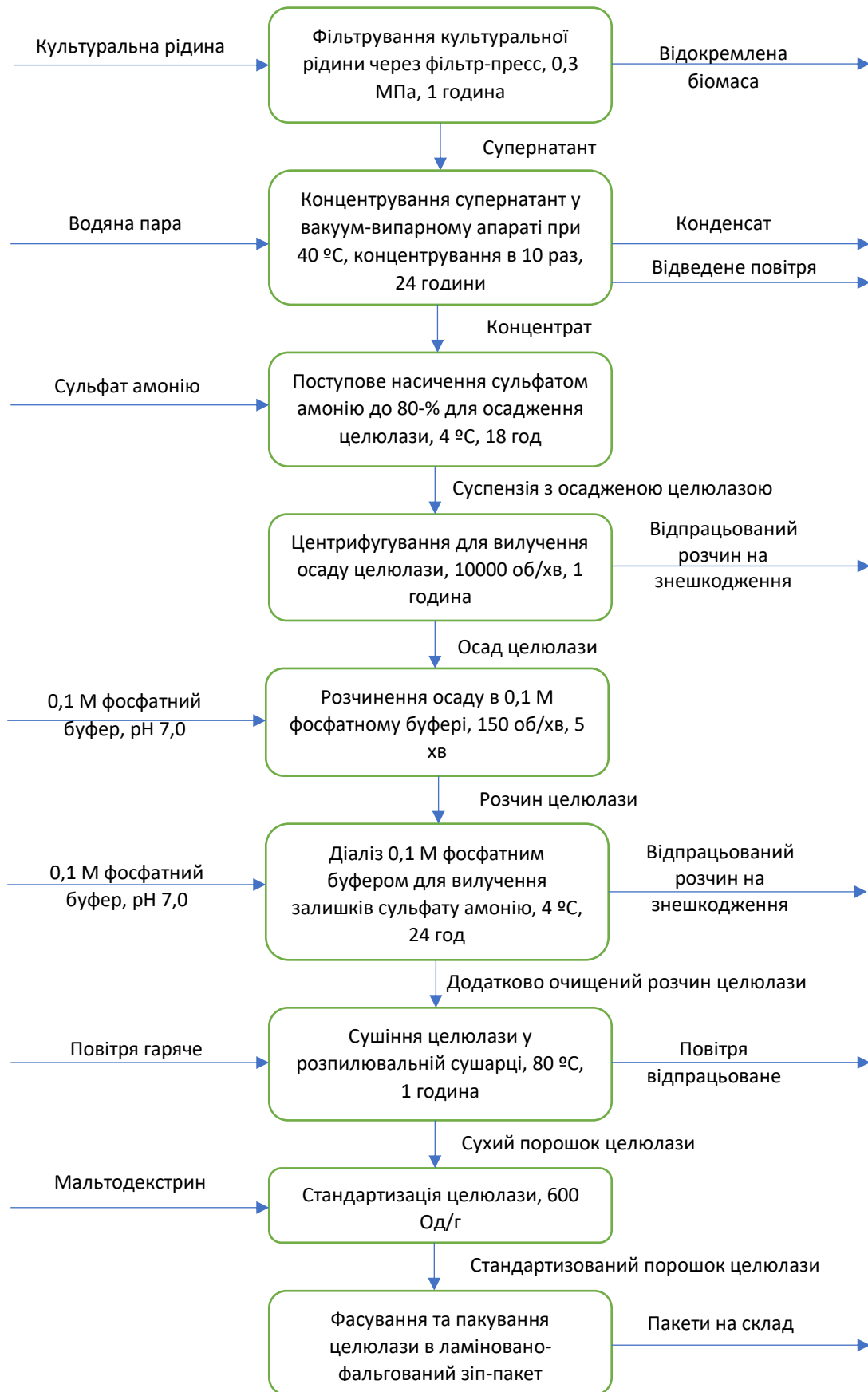


Рис.7.1. Узагальнена блок-схема очистки целюлази

властивості целюлази та забезпечують однорідність продукту (наприклад, лактоза, мальтодекстрин або крохмаль). Процес стандартизації включає контроль целюлазної активності, вологості та сипучості порошку, що дозволяє характеристиками, придатний для промислового застосування та дозування у виробничих процесах.

Сухий целюлазний препарат фасують у герметичну волого- та газонепроникну тару, що запобігає зволоженню та окиснювальній деградації ферменту під час зберігання і реалізації.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Процес культивування *T. viride* для одержання целюлази проводиться за умов, що забезпечують асептичність. Мікробіологічний контроль потрібен для перевірки стерильності поживних середовищ для інокуляту та основного біосинтезу, а також для виявлення сторонньої мікрофлори у посівному матеріалі та культуральному фільтраті під час росту гриба. Для цього здійснюють висів проб на чашки Петрі з відповідними агаризованими середовищами та проводять спостереження колоній після інкубування (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

Проби стерильних поживних середовищ (приблизно 50 мл) висівають безпосередньо на агаризовані середовища, призначені для вирощування грибів і дріжджів, наприклад, сусло агар (СА) та для ідентифікації бактерій (м'ясо-пептонний агар, МПА). Для перевірки чистоти культуральної рідини та інокуляту беруть 0,1 мл проби, рівномірно розподіляють її по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя і інкубують при 28–30 °С протягом 48–72 годин для ідентифікації грибів та/або дріжджів та при 35-37 °С протягом 24-48 годин для ідентифікації бактерій. Якщо середовище стерильне за зазначений час ріст культур повинен бути відсутнім (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

Контроль чистоти культури проводять методом виснажувального штриха, щоб отримати ізольовані колонії. Після інкубації колонії досліджують під світловим мікроскопом на збільшенні 8x та 40x. У разі відсутності сторонніх мікроорганізмів спостерігають характерний міцелій гриба, утворений гіфами, петельками та конідієносцями з конідіями. Для фарбування застосовують, наприклад, метиловий синій, завдяки чому міцелій та спори набувають синьо-

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Балацький М.О.			РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					56	66
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

фіолетового забарвлення .

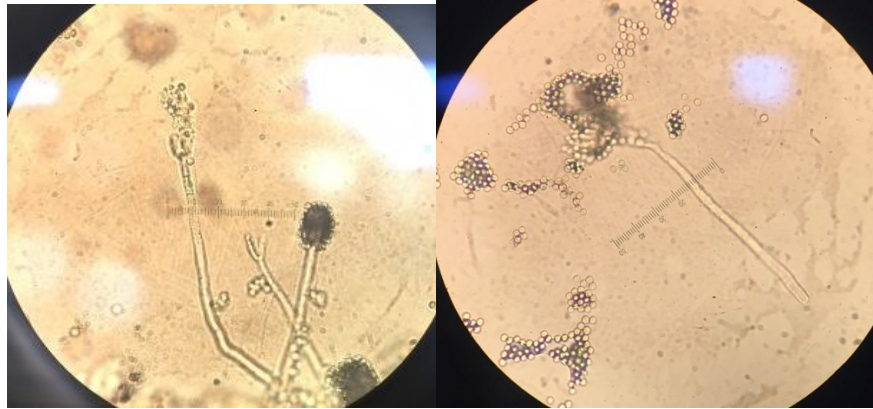


Рис.8.1. Міцелій та конідії під мікроскопом *T. viride*

(<https://mycology2018.blogs.bucknell.edu/2018/04/21/trichoderma-viride/>)

Для посівів використовують поживні середовища, які сприяють росту сапрофітних аеробних грибів: PDA (картопляно-декстрозний агар), Czapek-Dox Agar (агаризоване середовище Чапека) або агар на основі дріжджового екстракту і пептону. Після інкубації колонії гриба на PDA мають характерні ознаки: поверхня колоній бархатиста або трохи пухка, міцелій світло-зелений до темно-зеленого, краї колоній чіткі або злегка хвилясті, центральна частина часто світліша або білувата. Інкубація триває 2–4 дні, залежно від щільності міцелію та стадії росту гриба (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018).



Рис.8.2. Міцелій *T. viride* на агаризованому середовищі (<https://www.gba-group.com/en/blog/environment/schimmelpilz-trichoderma-viride/>)

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

Для оцінки ефективності культивування *T. viride* визначають кілька ключових показників: концентрацію біомаси, концентрацію та активність целюлази, а також залишкову концентрацію джерел вуглецю та азоту. Контроль цих параметрів здійснюють у комплексі за чітко визначеною методикою.

8.2.1. Концентрація біомаси (гранул)

Біомасу у вигляді гранул відокремлюють від культуральної рідини за допомогою фільтрування через фільтрувальний папір, який було висушено до абсолютно сталої маси. Відділені пелети промивають стерильною водою і висушують при 105 °С до постійної маси. Концентрацію сухої біомаси визначають шляхом зважування та виражають у грамах на літр культуральної рідини (г/л). Вимірювання виконують у трьох паралельних пробах, щоб забезпечити точність та відтворюваність результату (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

8.2.2. Концентрація та активність целюлази

Метод Бредфорда ґрунтується на зв'язуванні коомасі Брі (Coomassie Brilliant Blue G-250) з білками та зміні спектральних характеристик барвника. Для визначення концентрації ферменту проводять наступні етапи (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018):

Культуральну рідину центрифугують при 10 000 об/хв протягом 10 хвилин при 4 °С, щоб відділити міцелій. Отриманий супернатант використовують як пробу для аналізу. Розчин білка (наприклад, білок BSA) готують у серії градуйованих концентрацій (0,1–1,0 мг/мл). Кожну стандартну пробу обробляють реактивом Бредфорда у співвідношенні 1:5 та інкубують 5–10 хв при кімнатній температурі. До 0,1–0,2 мл ферментного розчину додають реактив Бредфорда у відповідному співвідношенні та інкубують 5–10 хв. Абсорбцію визначають при 595 нм на спектрофотометрі. Концентрацію білка розраховують за стандартною кривою і виражають у мг/мл. Для підвищення точності аналіз проводять у трьох повтореннях.

Активність ферменту оцінюють за здатністю каталізувати гідроліз карбоксиметилцелюлози (КМЦ) з утворенням відновлених цукрів, які

визначають методом DNS (3,5-дихідроксибензоатриазону). Процедура включає: 0,5–1 мл культурального супернатанту змішують з 1–2 мл 1% розчину КМЦ у 0,1 М фосфатному буфері, рН 5,0–6,0; суміш інкубують при оптимальній температурі для ферменту (зазвичай 50 °С) протягом 30 хвилин; додають 3 мл реактиву DNS для блокування гідролізу та підготовки до колориметричного визначення. Суміш нагрівають у киплячій водянній бані протягом 5 хв для розвитку кольору; абсорбцію вимірюють при 540 нм. Концентрацію відновлених цукрів визначають за стандартною кривою глюкози. Одна ферментативна одиниця (U) визначається як кількість ферменту, що каталізує утворення 1 мкмоль відновленого цукру за хвилину. Активність виражають у U/мл (U/л) культуральної рідини або U/г сухої біомаси. Кожен вимір проводять у трьох повтореннях для забезпечення статистичної достовірності (Dong, Wang, Xu, Li, & Li, 2018).

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю (карбоксиметилцелюлоза натрієва)

Контроль концентрації карбоксиметилцелюлози натрієвої (КМЦ-Na) у культуральній рідині є важливим показником технологічного процесу, оскільки цей субстрат виступає основним джерелом вуглецю і одночасно індуктором синтезу целюлаз *T. viride*. Одним із придатних для технологічного контролю методів є колориметричний спектрофотометричний аналіз, що дозволяє кількісно визначати КМЦ-Na у розчинах на основі зміни інтенсивності забарвлення у присутності індикатора (Yan, & Chai, 2021).

У запропонованому методі використовується колориметричний індикатор, наприклад, метиленовий синій, який зв'язується з аніонними групами КМЦ-Na і змінює спектральні характеристики забарвлення. При додаванні аналізованого розчину КМЦ-Na до фіксованої кількості індикатора відбувається залежно від концентрації полімеру загасання абсорбції при певній довжині хвилі (наприклад, 597 нм), що реєструється спектрофотометрично. Така залежність є лінійною в межах робочого діапазону визначення, і концентрацію КМЦ-Na визначають за

каліброваною стандартною кривою, побудованою на серії еталонних розчинів відомих концентрацій КМЦ-Na (Yan, & Chai, 2021).

Відбирають 5–10 мл культуральної рідини. Пробу центрифугують (наприклад, 8 000–10 000 об/хв, 10 хв) або фільтрують для видалення біомаси та зважених часток. Надосадову рідину розводять до необхідного об'єму у фосфатному або іншому відповідному буфері, що не взаємодіє з індикатором. Визначену кількість проби змішують із заданою кількістю колориметричного індикатора (метиленовий синій або аналог) у співвідношенні 1:1, інкубують при кімнатній температурі ~10 хв для встановлення колоїдної взаємодії. Абсорбцію готового розчину вимірюють на спектрофотометрі при вибраній довжині хвилі, 597 нм (що відповідає максимуму поглинання комплексу індикатор–КМЦ-Na). Концентрацію КМЦ-Na у пробі визначають за стандартною кривою, побудованою для серії еталонних розчинів КМЦ-Na відомої концентрації (Yan, & Chai, 2021).

Цей колориметричний підхід є простим, чутливим і дозволяє оперативно оцінювати залишкові концентрації КМЦ у процесі ферментації, що важливо для аналізу ступеня споживання вуглецевого субстрату та корекції режиму культивування без застосування більш складних методів (наприклад, ВЕРХ).

8.2.4. Концентрація джерела азоту (сульфат амонію)

Контроль концентрації джерела азоту, представленого сульфатом амонію ((NH₄)₂SO₄), необхідний для оцінки споживання азотної складової поживного середовища під час росту *T. viride* та синтезу целюлази. Сульфат амонію дисоціює в розчині з утворенням катіону амонію (NH₄⁺), який безпосередньо визначає доступність азоту для метаболізму культури, тому моніторинг цього іона дозволяє оцінити азотний баланс процесу (Skok, Bazel, & Vishnikin, 2023).

Для кількісного визначення концентрації амонію у пробах культуральної рідини використовують колориметричний метод з реактивом Несслера (Nessler's reagent) — один із стандартних спектрофотометричних підходів для амонійного азоту. Принцип методу базується на реакції катіону NH₄⁺ з реактивом Несслера, внаслідок чого утворюється комплексне забарвлене з'єднання йодиду

меркураммонію, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації амонію. Інтенсивність забарвлення вимірюється спектрофотометрично при певній довжині хвилі (часто $\approx 420\text{--}450$ нм), що дає можливість кількісно оцінювати вміст амонію у розчині (Skok, Bazel, & Vishnikin, 2023).

З культуральної рідини попередньо відокремлюють біомасу (пелети) центрифугуванням або фільтруванням. Відфільтрований супернатант може містити залишкові іони NH_4^+ . При необхідності пробу розводять дистильованою водою, щоб концентрація цільового іона потрапляла у робочий діапазон методу (Skok, Bazel, & Vishnikin, 2023).

До аліквоти проби додають стандартну кількість реактиву Несслера. За присутності амонійного іона утворюється забарвлена комплексна сполука. Інкубація проводиться за кімнатної температури протягом визначеного часу (наприклад, 5–15 хв), щоб забезпечити повну реакцію (Skok, Bazel, & Vishnikin, 2023).

Після встановлення комплексу вимірюють оптичну густину при довжині хвилі, відповідній максимуму поглинання комплексної сполуки (наприклад, 420–450 нм). Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації NH_4^+ у пробі (Skok, Bazel, & Vishnikin, 2023).

Для кількісного визначення складають стандартну криву на основі серії розчинів відомої концентрації амонію. На основі отриманої кривої за виміряною абсорбцією проби розраховують концентрацію NH_4^+ у культуральній рідині (Skok, Bazel, & Vishnikin, 2023).

Метод із реактивом Несслера є простим у реалізації, чутливим до мікроконцентрацій амонійного азоту та широко застосовується у контролі технологічних процесів, де потрібне оперативне визначення зміни концентрації амонію у розчинах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Brabcová, V., Štursová, M., & Baldrian, P. (2018). Nutrient content affects the turnover of fungal biomass in forest topsoil and the composition of associated microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, *118*, 187-198.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.12.012>

Chakraborty, S., Yadav, G., Saini, J. K., & Kuhad, R. C. (2019). Comparative study of cellulase production using submerged and solid-state fermentation. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 99-113). Elsevier.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_3

Cruz, E., Talma V.S., Barbosa, B. J., Bolzan, R.P., Ladeira, S.A., Carvalho, R.V., & Martins, M. L. (2024). Spray drying of cellulases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2. *Bioscience Journal*, *40*. <https://doi.org/10.14393/BJ-v40n0a2024-64855>

Dong, M., Wang, S., Xu, F., Li, Q., & Li, W. (2018). Addition of aluminum oxide microparticles to *Trichoderma viride* My preculture enhances cellulase production and influences fungal morphology. *Engineering in Life Sciences*, *18*(6), 353-358. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700188>

Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, *6*(3), 44.

<https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

Ekambaram, R., Kannaiyan, A., Marimuthu, V., Swaminathan, V. C., Renganathan, S., & Perumal, A. G. (2014). CARd-3D: Carbon distribution in 3D structure program for globular proteins. *Bioinformatics*, *10*(3), 138.

Farhan, M., Hasani, I. W., Khafaga, D. S., Ragab, W. M., Ahmed Kazi, R. N., Aatif, M., ... & Fahim, Y. A. (2025). Enzymes as catalysts in industrial biocatalysis: Advances in engineering, applications, and sustainable integration. *Catalysts*, *15*(9), 891.

<https://doi.org/10.3390/catal15090891>

Galić, M., Stajić, M., & Čilerdžić, J. (2022). Dynamics of pretreated wheat straw saccharification by cellulosome of *Trichoderma viride*. *Cellulose Chemistry and Technology*, *56*(9-10), 1013-1019.

Hawkins, H. J., Cargill, R. I., Van Nuland, M. E., Hagen, S. C., Field, K. J., Sheldrake, M., ... & Kiers, E. T. (2023). Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool. *Current Biology*, 33(11), R560-R573.

Kamaluddeen, S. Y., & Madika, A (2023). Production of Cellulase by *Trichoderma viride* via Submerged Fermentation using Corncob as Substrate. *Nig. J. Pure & Appl. Sci*, 36 (1). <https://doi.org/10.48198/NJPAS/22.B12>

Kumar, A., & Maravi, P. (2021). Cellulase: distribution, production, characterization and industrial applications. *Biotechnology Journal International*, 25(3), 36-71. <https://doi.org/10.9734/bji/2021/v25i330143>

Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species?. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2418-2428. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2418-2428.1999>

Liu, J., Lian, H., Dou, J., Li, J., Zhu, G., Wang, J., ... & Li, M. (2025). Physiological impact of *Trichoderma viride* agents on the quality and production of melon that is grown on soils continuously cropped to melon. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 9, 1513324. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2025.1513324>

Patel, N., Choy, V., Malouf, P., & Thibault, J. (2009). Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. *Process Biochemistry*, 44(10), 1164-1171. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.011>

Pavlenko, A., Kopilov, E. P., Nadkernychna, O. V., Tsekhmister, H. V., & Kyslynska, A. S. (2022). Cellulase and Polygalacturonase Activity by *Trichoderma viride*. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 87(1), 35-43.

Peres, F. A. P., Bondarczuk, B. A., Gomes, L. D. C., Jardim, L. D. C., Corrêa, R. G. D. F., & Baierle, I. C. (2025). Advances in food quality management driven by Industry 4.0: A systematic review-based framework. *Foods*, 14(14), 2429. <https://doi.org/10.3390/foods14142429>

Ribeiro, D. S., Henrique, S. M., Oliveira, L. S., Macedo, G. A., & Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(4), 635-641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02177.x>

Rodrigues, V. J., & Odaneth, A. A. (2021). Industrial application of cellulases. In *Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases* (pp. 189-209). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00007-7>

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>

Shahid, M., Srivastava, M., Singh, A., Kumar, V., Rastogi, S., Pathak, N., & Srivastava, A. (2014). Comparative study of biological agents, Trichoderma harzianum (Th-Azad) and Trichoderma viride (01PP) for controlling wilt disease in pigeon pea. *J Microb Biochem Technol*, 6(2), 110-5. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000130>

Shamala, T. R., Basavaiah, S. V., Joshi, G. J., & Csir, C. O. S. a. I. R. (2003, December 23). *WO2005070234A1 - Process for the production of sediment free clarified fruit juices* - Google Patents. <https://patents.google.com/patent/WO2005070234A1/en>

Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Dhakal, A., Koirala, D., ... & Maharjan, J. (2023). Characterization of thermostable cellulase from Bacillus licheniformis PANG L isolated from the himalayan soil. *International Journal of Microbiology*, 2023(1), 3615757. <https://doi.org/10.1155/2023/3615757>

Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of Trichoderma species at varying pH, temperature and agitation. *Virol Mycol*, 3(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0517.1000127>

Singh, J., Kundu, D., Das, M., & Banerjee, R. (2019). Enzymatic processing of juice from fruits/vegetables: An emerging trend and cutting edge research in food biotechnology. *Enzymes in food biotechnology*, 419-432. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00024-4>

Singhania, R. R., Patel, A. K., Saini, R., & Pandey, A. (2017). Industrial enzymes: β -glucosidases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 103-125). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00005-1>

Skok, A., Bazel, Y., & Vishnikin, A. (2023). A new miniaturized microextraction HS-LPME-OIP procedure for ammonium determination based on Nessler's method. *Chemical Papers*, 77(12), 7303-7309. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02903-3>

Sokolyuk, K. Y., Bondarenko, V., & Sokolyuk, I. Y. (2025). Current trends, challenges, and development prospects of Ukraine's juice product foreign trade in wartime conditions. *Economic innovations*, 27(2 (95)), 125-136. [https://doi.org/10.31520/ei.2025.27.2\(95\).125-136](https://doi.org/10.31520/ei.2025.27.2(95).125-136)

Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (2004). Protein and amino acids for athletes. *Food, Nutrition and Sports Performance II*, 104-129.

Toushik, S. H., Lee, K. T., Lee, J. S., & Kim, K. S. (2017). Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *Journal of food science*, 82(3), 585-593. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>

Yan, N., & Chai, X. S. (2021). Rapid determination of the content of carboxymethyl cellulose sodium in aqueous solution by a color indicator-assisted spectroscopy. *Polymer Testing*, 93, 106990. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106990>

Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in microbiology*, 14, 1160551. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>

You, C., Liu, Y. J., Cui, Q., & Feng, Y. (2023). Glycoside hydrolase family 48 cellulase: A key player in cellulolytic bacteria for lignocellulose biorefinery. *Fermentation*, 9(3), 204. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030204>

Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K. Q., & Yu, Z. (2021). New species of Trichoderma isolated as endophytes and saprobes from Southwest China. *Journal of fungi*, 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>

Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: методичні рекомендації до вивчення

дисципліни, проведення практичних занять та виконання контрольної роботи для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр», спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. та заоч. форм навч. / уклад. В.О. Красінько, Т.Л. Сулейко, В.М. Удимович, К.: НУХТ, 2022. – 45 с.