

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 СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СТАРІНСЬКОГО Сергія Віталійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез полісахариду курдлану *Agrobacterium sp. i Trichoderma harzianum*

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, доцент, к.т.н.

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

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

2.Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3.Вихідні дані до роботи: біологічний агент - *Agrobacterium sp. i Trichoderma harzianum*; цільовий продукт – курдлан; геометричний об'єм ферментера – 10 м³; коефіцієнт заповнення – 0,55.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; виділення та очищення цільового продукту; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема біосинтезу курдлану – 2 аркуші формату А2;

Технологічна схема біосинтезу курдлану – 1 аркуш формату А2.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.03.25 – 09.03.25	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.03.25 – 22.03.25	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	24.03.25 – 04.04.25	
4.	Біосинтез цільового продукту	05.04.25 – 11.04.25	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	12.04.25 – 26.04.25	
6.	Специфікація обладнання	27.04.25 – 04.05.25	
7.	Опис технологічної схеми	05.05.25 – 17.05.25	
8.	Виділення та очищення цільового продукту	05.05.25 – 17.05.25	
9.	Контроль виробництва	18.25.25 – 21.04.25	
10.	Оформлення кваліфікаційної роботи	21.05.25 - 28.05.25	
11.	Оформлення графічної частини	21.05.25- 28.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Сергій СТАРІНСЬКИЙ
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

This qualification work describes the biosynthesis, isolation and purification of the polysaccharide curdlan in the form of a dry powdery substance, which will be used in the future as a biologically active supplement for immunostimulation. Biosynthesis is carried out by microorganisms *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and *Trichoderma harzianum* GIM 3.442, they jointly synthesize 47.9 g/l of the target product. During the performance of this work, the estimated value of the production capacity of curdlan was obtained as 7,890 kg kg/year.

The technology of production of curdlan includes (preparation of aeration air; preparation of titration agents; preparation of auxiliary substances; preparation and sterilization of nutrient media for growing seed material in flasks, inoculators and production biosynthesis in a fermenter with a volume of 10 m³), (growing seed material and the biosynthesis process itself; preparation of culture fluid, separation of biomass, isolation of the main target product by precipitation, purification of curdlan, drying to powder and subsequent packaging in commercial forms).

The qualification work contains 100 pages of printed text, 21 tables, 10 figures, and also consists of an introduction, 9 sections, a list of used literature (sources) and a graphic part (3 drawings of A1 format).

Keywords: curdlan, biological agent, production biosynthesis, *Agrobacterium* sp. and *Trichoderma harzianum*.

РЕФЕРАТ

В даній кваліфікаційній роботі, описано біосинтез, виділення та очищення полісахариду курдлану у вигляді сухої порошкоподібної субстанції, в подальшому будемо використовувати її в якості біологічно активної добавки для імуностимуляції. Біосинтез здійснюється мікроорганізмами *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 вони спільно синтезують 47,9 г/л цільового продукту. В ході виконання данної роботи було отримане розрахункове значення потужності виробництва курдлану 7 890 кг кг/рік.

Технологія виробництва курдлану включає в собі (підготовку аераційного повітря; приготування титрувальних агентів; приготування допоміжних речовин; підготовку та стерилізацію поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в колбах, інокуляторах та виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³), (вирощування посівного матеріалу та сам процес біосинтезу; підготовка культуральної рідини, відділення біомаси, виділення основного цільового продукту методом осадження, очистка курдлану, сушіння до порошку та подальше упакування у товарні форми).

Кваліфікаційна робота містить 100 сторінок друкованого тексту, 21 таблицю, 10 рисунків, а також складається зі вступу, 9 розділів, списку використаної літератури (джерел) та графічної частини (3 креслень формату А1).

Ключові слова: курдлан, біологічний агент, виробничий біосинтез, *Agrobacterium* sp. і *Trichoderma harzianum*.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КУРДЛАНУ	9
1.1 Загальна характеристика курдлану	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	12
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	21
3.1 Актуальність	21
3.2. Потреба у цільовому продукті	21
3.3. Розрахунок потужності виробництва	24
3.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера	25
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	31
4.1. Шлях катаболізму глюкози у <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749	31
4.2. Шлях катаболізму ростового субстрату у продуцента курдлану	32
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	35
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	35
5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	37
5.3 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	37
5.3.1. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва курдлану	44
5.4 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749 і <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3.442 – продуцентів курдлану	50
Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів	58
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	60
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ	66
РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КУРДЛАНУ	78
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	81
9.1. Мікробіологічний контроль	81
9.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій та курдлану	83

9.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецю (глюкози) у середовищі	84
9.2.3. Визначення концентрації джерела Нітрогену (дріжджовий екстракт, сульфат амонію) у середовищі	84
ЛІТЕРАТУРА	95

ВСТУП

Полісахариди це макромолекули, вони належать до вуглеводів. Їх хімічна структура дуже різноманітна і вони зазвичай не токсичні, тому є привабливими їх застосування у різних галузях для виробників. Завдяки своїй структурі полісахариди використовують як добавки: загусники, емульгатори, або підсилювачі смаку, гелеутворювачі. Кількість населення на планеті стрімко зростає, а з цим і зростає проблема харчування для людей. Тому виробництво полісахаридів є актуальним для нас. А використовуючи мікробіологічний метод ми можемо здешевити виробництво при цьому якість наших продуктів залишиться не змінна. [1]

Курдлан нейтральний лінійний полімер відноситься до β -(1 \rightarrow 3) глюканів. Має широке застосування у різних галузях. Біотехнологічний спосіб виробництва курдлану є екологічним і не утворює шкідливих побічних продуктів. Крім того, біотехнологічний спосіб виробництва курдлану дозволяє отримати продукт з вищою якістю і нижчою собівартістю, ніж традиційний спосіб. З урахуванням цих переваг, біотехнологічне виробництво курдлану є актуальною технологією, яка має великий потенціал для розвитку. Продуцентами курдлану можуть бути бактерії родів *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Cellulomonas*, *Bacillus* дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, а також гриби родів *Aureobasidium pullulan*, *Poria cocos*.

Новизною роботи є те, що ми впроваджуємо методику біосинтезу з використанням штаму *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 . Він в свою чергу продукує найбільше курдлану серед своїх конкурентів (47,9 г/л) і має найдешевше поживне середовище. Та потенційне використання курдлану у виробництві БАДів[2]

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Старінський С.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю. М.				8	100
Реценз.					8		
Н.Контр					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.					

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КУРДЛАНУ

1.1 Загальна характеристика курдлану

Курдлан - це полісахаридний гель, який виробляється бактеріями роду *Bacillus*. Вперше він був отриманий з культури *Alcaligenes* sp. у 1966 році. Без розгалужень або заміників, курдлан є лінійним полісахаридом, що складається з повторюваної одиниці і має три конформери, одинарну спіраль, потрійну спіраль і випадковий клубок. Він має високу в'язкість, а також має здатність утворювати гелі, це робить його цінним інгредієнтом у харчовій промисловості і не тільки. Полісахариди присутні в різних живих організмах, включаючи найпростіші, водорості та інші рослини, дріжджі, гриби. [4]

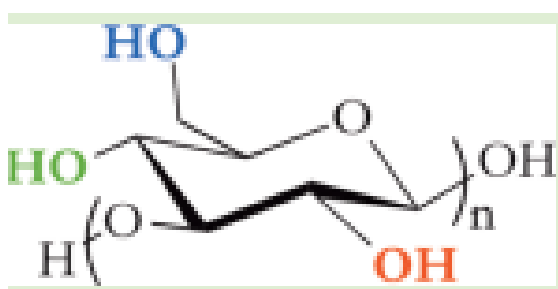


Рис.1.1. Структурна хімічна формула курдлану [4]

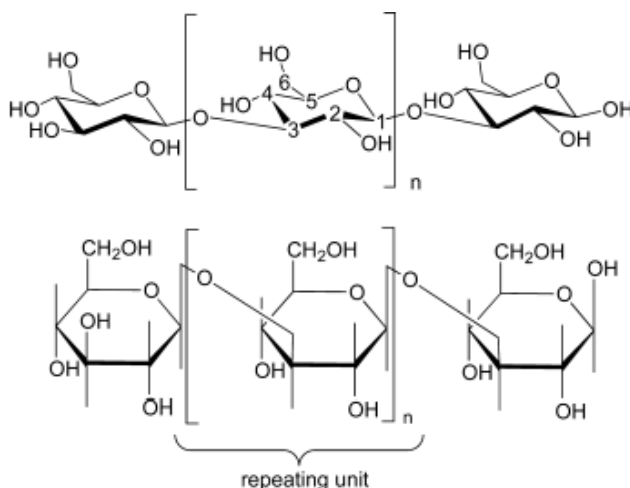


Рис.1.2. Молекулярна структура курдлану з β -(1 \rightarrow 3) зв'язками. [3]

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Старінський С.В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КУРДЛАНУ		
Перевір.		Резніченко Ю. М.					
Реценз.							
Н.Контр							
Затверд.		Стабніков В. П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						9	100
					9		
					Кафедра БТМ		

Хімічна структура курдлану складна і включає в себе ланцюги глюкози, галактози, арабінози та ксилози. З'єднання цих ланцюгів відбувається глікозидними зв'язками. [1]

Фізичні властивості курдлану включають:

- **В'язкість:** курдлан має дуже високу в'язкість у водному розчині. Це означає, що він може використовуватися для створення густих і тягучих текстур.

- **Гелування:** курдлан здатний утворювати гелі двох типів в залежності від температури нагрівання або додавання цукру. При нагріванні температурою 80 °C утвориться термо необоротний гель. А при температурі 55 °C утвориться термо оборотний гель, він може розщеплюватися при охолодженні. Ці гелі стійкі до розчинення і мають хорошу стійкість до заморожування-розморожування. Цій властивості полісахарид завдячує своїй структурі. Механізм гелеутворення можна розглядати як зшивання потрійних спіралей з асоційованих одиночних спіралей і мікрофібрил. [1], [4]

- **Розчинність:** має підвищену органічну розчинність, порівняно з багатьма іншими природними полісахаридами- це полегшує хімічні реакції та переробку. Розчинний у воді при високих температурах, але нерозчинний у спирті. [1]

- **Колір:** курдлан має білий або кремовий колір.

- **Смак:** курдлан має нейтральний смак. [1]

Застосування курдлану

- **Харчова промисловість:** курдлан широко застосовується в харчовій промисловості, тому що має гелеутворюючі властивості та є їстівним його використовують в якості харчової добавки, як стабілізатор, або загусник. Його можна використовувати в таких продуктах, як морозиво, йогурт, соуси, салатні заправки та десерти. Було продемонстровано, що він також покращує текстуру багатьох видів їжі, таких як локшина та тофу. Крім поліпшення якості, курдлан також може певною мірою замінювати жир у приготуванні нежирного м'яса. [4]

- **Косметика:** курдлан використовується в косметиці для створення гелів та емульсій. Його використовують, як засіб для зволоження та пом'якшення шкіри.

- **Медицина:** курдлан курдлан має протипухлинну, антибактеріальну та противірусну дію. Досліджується як потенційний засіб для лікування захворювань, таких, як діабет, рак і серцево-судинні захворювання. Похідні курдлану стимулюють дендритні клітини через рецептори клітинної поверхні TLR4 і дектин-1, тим самим сприяючи експресії Т-клітин та цитокін, які можуть пригнічувати метастазування раку та значно підвищують протираковий імунітет [2]

Курдлан є безпечним і корисним харчовим інгредієнтом. Він має низку переваг, включаючи: підвищує в'язкість і стійкість продуктів, збільшує термін зберігання продуктів, покращує смакові якості продуктів.[1]

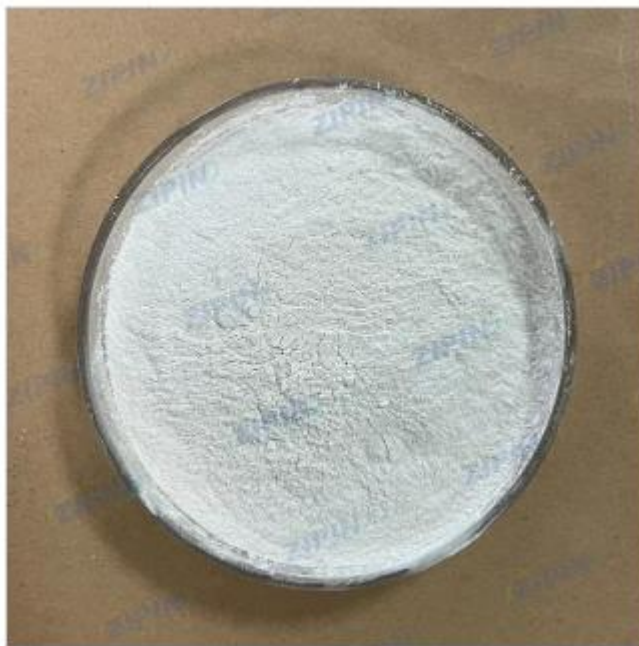


Рис.1.3. Зображення курдлану [1]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Згідно даних, наведених у літературі [5], курдлан є позаклітинним полісахаридом, що синтезується виключно мікроорганізмами і складається із мономерів глюкози, що пов'язані 1-3 β-глікозидними зв'язками із середньою молекулярною масою від 5.3×10^4 до 2.0×10^6 Да.

Найбільш описаними у літературі продуцентами із високим виходом курдлану є бактерії таких родів *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Cellulomonas*, *Bacillus* дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, а також гриби родів *Aureobasidium pullulan*, *Poria cocos*. Штами мікроорганізмів були виділені в основному із землі та коріння рослин. Головними проблемами під час промислового виробництва курдлану є висока вартість джерел вуглецю (глюкози та сахарози), а також трудомісткість очищення полісахариду, оскільки не зважаючи на те, що він є позаклітинним метаболітом, молекули курдлану міцно прикріплені до клітинної стінки продуцента і розділення потребує значних зусиль [5-9].

Бактерії зазвичай синтезують курдлан у відповідь на стресові фактори зовнішнього середовища. Мала кількість азоту є одним із найважливіших сигналів для біосинтезу курдлану. Дефіцит азоту безпосередньо впливає на надходження амінокислот для трансляції білків, що призводить до уповільнення або припинення синтезу ферментів. Також він знижує швидкість циклу трикарбонових кислот, уповільнює метаболічну активність і знижує доступність попередників курлану [12]. Окрім того, конкуруючі шляхи біосинтезу курдлану (такі як синтез ліпополісахариду та пептидоглікану) також відповідають за значне споживання енергії та потік вуглецю. Внаслідок цього низький рівень перетворення глюкози при виробництві курдлану збільшує вартість великомасштабного виробництва [2].

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА					
Розроб.		Старінський С.В.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю. М.							12	100
Реценз.								12		
Н.Контр								Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.								

У табл. 2.1 наведені результати біосинтезу курдлану різними мікроорганізмами. Найбільша кінцева концентрація екзополісахариду спостерігається за використання змішаної культури *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 (47,9 г/л) протягом 144 год [6]. Нижча концентрація курдлану характерна для *Rahnella variigena* ICRI91 (21,50 г/л), що вирощували протягом 120 год [7]. Протягом 72 год вирощування продуцент *Agrobacterium sp.* IFO 13140 накопичив 19,45 г/л [8], в той час як *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 – лише 1,6 г/л [9]. Варто зазначити, що усі порівнювані біологічні агенти як джерело вуглецевого живлення асимілювали глюкозу у різних концентраціях – 40, 50, 60 і 80 г/л відповідно.

Таблиця 2.1

Особливості одержання курдлану різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація курдлану, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749 і <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3.442	Глюкоза Пшеничні висівки Дріжджовий екстракт (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O	80 20 1 2 3 1,5	144	47,9	t° = 30 C, частота обертів 200 об/хв	Liang Y., Zhu L., Ding H., Gao M., Zheng Z., Wu J., Zhan X. Enhanced production of curdlan by coupled fermentation system of <i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749 and <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3.442. <i>Carbohydr Polym.</i> 2017, 157:1687-1694. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.055.
<i>Rahnella variigena</i> ICRI91	Глюкоза KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O ZnCl ₂ CoCl ₂ ·6H ₂ O MnSO ₄ ·H ₂ O	60,00 1,50 1,50 0,75 5,00 1,00 1,00 2,00	120	21,50	t° = 30 C, частота обертів 160 об/хв	Rofeal M., Abdelmalek F., Pietrasik J., Steinbüchel A. Sustainable curdlan biosynthesis by <i>Rahnella variigena</i> ICRI91 via alkaline hydrolysis of <i>Musa sapientum</i> peels and its edible, active and modified hydrogel for Quercetin controlled release. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> 2023, 15(225):416-429. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.080.

Закінчення табл. 2.1

<i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> IFO 13140	Глюкоза	50,00	72	19,45	t° = 30 C, частота обертів 150 об/хв	Martinez C. O., Ruiz S. P., Nogueira M. T., E. Bona, Portilho M., Matioli G. Effective Immobilization of <i>Agrobacterium sp.</i> IFO 13140 Cells in Loofa Sponge for Curdlan Biosynthesis. <i>Molecules</i> . <i>Molecules</i> 2015, 20(5):7957-7973. doi: 10.3390/molecules20057957
	NH ₄ Cl	1,60				
	KH ₂ PO ₄	2,70				
	CaCO ₃	3,00				
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50				
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,00				
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,00				
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,00				
ZnCl ₂	1,00					

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
курдлану**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Rahnella variigena</i> ICRI91	Глюкоза	60,00	42,00	2,52	<u>6</u>
	KH ₂ PO ₄	1,50	180,00	0,27	<u>1</u>
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50	60,00	0,09	<u>1</u>
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	324,00	0,243	<u>2</u>
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,00	70,00	0,35	<u>1</u>
	ZnCl ₂	1,00	93,00	0,093	<u>1</u>
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,00	2280,0	2,28	<u>3</u>
	MnSO ₄ ·H ₂ O	2,00	1988,00	3,976	<u>2</u>
Вартість 1 л середовища – 9,82 грн					
<i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> IFO 13140	Глюкоза	50,00	42,00	2,10	<u>6</u>
	NH ₄ Cl	1,60	46,00	0,073	<u>1</u>
	KH ₂ PO ₄	2,70	180,00	0,48	<u>1</u>
	CaCO ₃	3,00	98,00	0,29	<u>1</u>
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50	324,00	0,16	<u>2</u>
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,00	53,00	0,05	<u>1</u>
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,00	220,00	0,22	<u>1</u>
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,00	205,00	0,20	<u>4</u>
	ZnCl ₂	1,00	93,00	0,09	<u>1</u>
Вартість 1 л середовища – 3,66 грн					
<i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 і <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3.442	Глюкоза	80,00	42,00	3,36	<u>6</u>
	Пшеничні висівки	20,00	25,00	0,5	<u>5</u>
	Дріжджовий екстракт	1,00	1800,00	0,18	<u>1</u>
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00	60,00	0,12	<u>1</u>
	KH ₂ PO ₄	3,00	180,00	0,3	<u>1</u>
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,50	324,00	0,486	<u>2</u>
Вартість 1 л середовища – 4,95 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2024 р.

1 – <https://prom.ua/ua>, 2 – <https://fresh.co.ua/>, 3 – <https://www.systopt.com.ua/>, 4 – <https://flagma.ua/>, 5 – <https://natfood.com.ua/>, 6- <https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza>

Далі розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів курдлану (табл. 2.2). Як зазначено у табл. 2.2, найбільш дешевим поживним середовищем вартістю 3,66 грн, є середовище для культивування *Agrobacterium sp.* IFO 13140. Найбільш дорогим, вартістю 9,82 грн, є середовище для культивування *Rahnella variigena* ICRI91. Вартість поживного середовища для культивування змішаної культури *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 склала 4,95 грн відповідно.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г курдлану, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація курдлану, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного курдлану за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Rahnella variigena</i> ICRI91	21,50	120	0,18	9,82	0,46
<i>Agrobacterium sp.</i> IFO 13140	19,45	72	0,27	3,66	0,19
<i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749 і <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3.442	47,9	144	0,33	4,95	0,1

Щоб остаточно визначити найефективніший біологічний агент, необхідно підрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Із даних, наведених у табл. 2.3, видно, що найменша кількість синтезованого курдлану за 1 год (0,18 г/год) спостерігається у *Rahnella variigena* ICRI91, а найбільша – 0,33 г/год у змішаної культури *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і

Trichoderma harzianum GIM 3.442. Умовна вартість цільового продукту найнижча у змішаній культурі *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 (0,1 грн/г). Найвища умовна вартість цільового продукту 0,46 грн/г у *Rahnella variigena* ICRI91.

Отже, для біосинтезу цільового продукту обираємо змішану культуру *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442, оскільки за використання відповідного бактеріального штаму вдається синтезувати курдлан концентрацією у 2 рази вищою, ніж за використання інших, взятих до порівняння біологічних агентів.

До складу поживного середовища входять пшеничні висівки, елементний склад яких не визначений та здатен варіюватися, тому проведення перевірного розрахунку складу такого середовища не є доцільним.

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

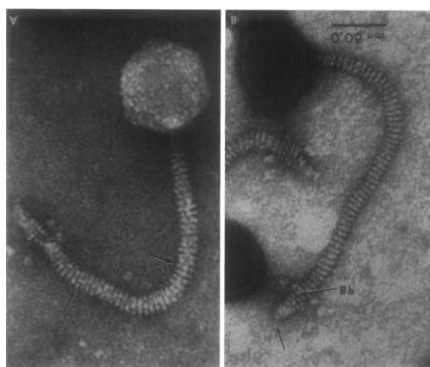


Рис.2.1. *Agrobacterium* грамнегативні бактерії

Agrobacterium є грамнегативні бактерії. Вони є у вигляді паличок, або коків $0,5-1,2 \times 1,0-3,0$ мкм. Неспороутворюючі, рухаються джгутиками (перетрихії).

Колонії на поживному агарі мають тонкі і не рівні краї. Не містять пігментів, сірувато-білі, напів прозорі опуклі. [10]

Ці бактерії облігатно аеробні. Оптимальна температура росту в межах 20-37 °С. Є нейтрофільними організмами. Оптимальна солонність 3%. Позитивні результати на каталазу та оксидазу.

Дана бактерія може використовувати: ацетат, D- і L- альфа-аланін, L-аспартат, бутират, капрат, цитрат, фумарат, L-глутамат, гліколат, DL-бета-гідроксибутират, L-ізолейцин, DL-лактат, L-лейцин, DL-норлейцин, малонат, L-малат, L-фенілаланін, L-пролін, пропіонат фенілацетат і сукцинат.

Негативні результати для гідролізу целюлози, ДНКаз, гідролізу ескуліну, виробництва H₂S, виробництва індолу, лізиндекарбоксілази, орнітиндекарбоксілази, гідролізу крохмалю, уреаз, виробництва кислоти з D-глюкози та D-ксилози.

Не використовуються: адипат, D- і L-арабіноза, амідалін, адонітол, D- і L-арабітол, арбутин, бета-аланін, L-аргінін, азелат, гамма-амінобутират, бензиламін, бутиламін, бетаїн, креатин, L-цитрулін, целобіоза, дульцитол, ескулін, етаноламін, мезо-еритритол, D-фруктоза, D-і L-фукоза, D-глюкоза, D-галактоза, D-глюконат, гліцерин, гентібіоза, глікоген, гістамін, м-гідроксибензоат, мезоінозит, ітаконат, інулін, 2- і 5-кетоглюконат, лактоза, D-ліксоза, левулінат, мезаконат, D-малат, D-манноза, мальтоза, мелезитоza, мелібіоза, N-ацетилглюкозаміну оксалат, пентиламін, пімелат, D-рибоза, рафіноза, L-рамноза, саліцин, L-сорбоза, суберат, сахароза, D і L-тартрат, мезо-тартрат. [10,11]

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Pseudomonadota</i>
Клас	<i>Alphaproteobacteria</i>
Порядок	<i>Hyphomicrobiales</i>
Родина	<i>Rhizobiaceae</i>
Рід	<i>Agrobacterium</i>
Вид	<i>Agrobacterium</i> [11]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Актуальність

Курдлан має протипухлинну, антибактеріальну та противірусну дію. Досліджується як потенційний засіб для лікування захворювань, таких як діабет, рак і серцево-судинні захворювання. Похідні курдлану збуджують дендритні клітини через рецептори клітинної поверхні TLR4 і дектин-1, цим сприяють експресії Т-клітин та цитокін, вони в свою чергу можуть пригнічувати метастазування раку та підвищувати протираковий імунітет. Однією з ключових переваг курдлану є його здатність стимулювати імунну систему, це робить його потенційним ад'ювантом у вакцинах або засобом для лікування інфекційних захворювань. Окрім того, його гідрофільність і механічна міцність дозволяють використовувати його для створення гідрогелів, які можна застосовувати, як кістяк для відновлення тканин, наприклад, шкіри, хрящів або кісток. [2]

3.2. Потреба у цільовому продукті

Сезонні вірусні інфекції, такі як грип та інші ГРВІ, є поширеною проблемою в холодну пору року. Вони спричиняють дискомфорт та можуть спричинити серйозні ускладнення, особливо для людей з ослабленим імунітетом. У таких випадках імуномодулятори можуть пригодитися [13].

Імуномодулятори – це лікарські засоби, які стимулюють імунну систему, а саме її захисні функції. Вони можуть допомогати організму боротися з вірусною інфекцією, зменшити тривалість захворювання та запобігти розвитку ускладнень.

Іміномодулятори можуть застосовуватися при:

- *ослабленому імунітеті*: люди з хронічними захворюваннями, літні люди, діти та ті, хто часто хворіє на ГРВІ, можуть мати

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		
Розроб.		Старінський С.В.			Літ.	Арк.	Архів
Перевір.		Резніченко Ю. М.				21	100
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н.Контр							
Затверд.		Стабніков В. П.					

ослаблений імунітет. У таких випадках імуномодулятори можуть допомогти зміцнити імунну систему та підвищити її опірність до вірусів.

- *важкий перебіг захворювання*: якщо людина вже захворіла на грип або іншу вірусну інфекцію, імуномодулятори можуть допомогти полегшити симптоми, зменшити тривалість захворювання та запобігти розвитку ускладнень, таких як пневмонія або бронхіт.
- *профілактика*: у періоди підвищеної захворюваності на вірусні інфекції імуномодулятори можуть бути використані для профілактики. Вони допоможуть підготувати імунну систему до зустрічі з вірусом та знизити ризик зараження.

Імуномодулятори слід приймати тільки за призначенням лікаря. Він підбере оптимальний препарат, дозування та тривалість курсу лікування, враховуючи індивідуальні особливості пацієнта та характер захворювання.

Біополімер курдлан — це лінійний бета-1,3-глюкан, який нерозчинний у воді, високомолекулярний глюкозний полімер. Курдлан складається із β-пов'язаних залишків глюкози він утворює еластичні гелі при нагріванні у водній суспензії.

Бета-1,3-глюкан не піддається розщепленню ферментами в шлунково-кишковому тракті. Клітини слизової оболонки кишечника залучають його та переносять у підслизовий шар. У підслизовому шарі він запускає макрофаги. Активовані макрофаги залучають лімфоцити, вони відповідають за захист ендотелію, тобто за місцевий імунітет. Активовані лімфоцити з кишечника переходять до слизових оболонок інших органів, забезпечуючи їх захист від інфекцій (механізм репопуляції).

Частина Бета-1,3-глюканів потрапляє з кров'ю через ворітну вену до печінки, де їх переносять спеціальні клітини. У відповідь на взаємодію з полісахаридами ці клітини виділяють цитокіни, які активують системний імунітет.

Бета-1,3-глюкани активують місцевий і системний імунітети, так вони забезпечують захист організму від вторгнення антигенів та знищення чужорідного мікробів, який вже проник всередину. Імуностимулююча дія бета-1,3-глюкану полягає в підвищенні активності імунної системи без її надмірної стимуляції, що є важливим для запобігання аутоімунним захворюванням.

Імунна система людини може потребувати підтримки в різних ситуаціях, зокрема:

- Хронічні захворювання різного характеру
- Інфекційні захворювання, як гострі, так і хронічні
- Сезонні захворювання, такі як грип та інші ГРВІ
- Захворювання шлунково-кишкового тракту (наприклад, кишкові інфекції)
- Захворювання печінки (гепатити, цироз)
- Запальні захворювання дихальних шляхів (ларингіт, бронхіт, пневмонія)
- Інфекції сечостатевої системи (цистит, пієлонефрит)
- Інші запальні процеси (герпес, фурункульоз)
- Періоди підвищеного фізичного та психоемоційного навантаження
- Профілактика запальних захворювань [14].

В таблиці 3.1 наведеній нижче відображені вихідні дані для розрахунку річної потреби у курдлані. Доза препарату обрана на основі препарату Life Source Basics (WGP Beta Glucan) [15], активатор імунної системи, 500 мг. Дані взяті з щорічного статистичного збірника за 2023 рік [16].

Вихідні дані розрахунку потреби курдлану

Таблиця 3.1

Назва інфекційних захворювань	Добова доза, г	Тривалість прийому, діб	Кількість курдлану на 1 людину, г	Кількість хворих у 2023р., люд.	Загальна кількість курдлану на рік, кг
Гострі кишкові інфекції, тис.	0,5	60	30	50600	1518
Вірусний гепатит, тис.	0,5	60	30	9900	297
Грип і гострі інфекції верхніх дихальних шляхів, млн	0,5	60	30	5200000	156000
Всього					157815

3.3. Розрахунок потужності виробництва

Оскільки на ринку України представлена велика кількість БАДів виготовлених іноземними країнами пропонуємо забезпечити 5% від потреб ринку, при цьому також врахуємо, що 25% хворих будуть приймати БАДи на основі бета-1,3-глюкану, при тому інші 75% хворих будуть приймати інші препарати.

$$\text{Отже, } 157815 \text{ кг} \times 0,25 \times 0,2 = 7890,75 = 7890 \text{ кг.}$$

Вихід курдлану за технологічною схемою, що використана у роботі, складає 47,9 г/л[8], у свою чергу потреба в Україні становить 7890 кг. Маємо наступний розрахунок об'єму культуральної рідини за рік:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 7890 / 47,9 = 164,7 \text{ м}^3$$

Окрім річного об'єму культуральної рідини необхідно враховувати можливі втрати, що можуть відбуватися при виділенні цільового продукту, врахуємо 40% і тоді річний об'єм становитиме:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 164,7 \times 1,4 = 230,58 \text{ м}^3$$

3.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера

Згідно розрахунків із п.п. 1.3, щоб забезпечити потребу у курдлані за рік, необхідно отримати 230,58 м³ культуральної рідини із урахуванням втрат на процеси виділення цільового продукту.

Кількість трудоднів у рік – 290 днів. Визначаємо об'єм культуральної рідини за добу ферментації з метою розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу. Маємо:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 230,58 / 290 = 0,79510 \text{ м}^3 \text{ (795,10 л)}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{цк} = \frac{K_1 \times V_d \times T_{цф}}{24} = \frac{1,1 \times 0,79510 \times 152,5}{24} = 5,5 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (тривалість виробничого біосинтезу (144 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год)).

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Розраховуємо виробничий об'єм ферментеру для культивування продуценту:

$$V_r = V_{цк} / K_3 = 5,5 / 0,55 = 10 \text{ м}^3.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_3 = 10 / 5,5 = 0,55$

3.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу курдлану *Agrobacterium sp.* ATCC 31749

Під час виробничого циклу об'єм отриманої культуральної рідини становить 5,5 м³. Однак необхідно враховувати, що частина цієї рідини (до 10%) втрачається на краплевинос.

Отже, робочий об'єм ферментера становить: $V_{роб.1} = V_{кр} \cdot (1 + E_f) = 5,5 \cdot 1,1 = 6,05 \text{ м}^3$, де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

За вибраного коефіцієнта заповнення 0,55 геометричний об'єм ферментера становить: $V_f = 6,05 / 0,55 = 11 \text{ м}^3$.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст1} = 10 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з1} = 6,05/10 = 0,6$. Перевірений коефіцієнт заповнення знаходиться в діапазоні 0,55-0,65 характерному для аеробних процесів, висновок, що геометричний об'єм посівного апарату визначено правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{роб.1} = 6,05 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати $V_{пм1} = V_{роб1} \cdot X_{\phi} = 6,05 \cdot 0,1 = 0,605 \text{ м}^3$ посівного матеріалу, де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити: $V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 6,05 - 0,605 = 5,445 \text{ м}^3 \approx 5,45 \text{ м}^3$.

Оскільки під час процесу отримання інокуляту частина культуральної рідини втрачається внаслідок краплевиносу (близько 10%), тому необхідно скоригувати розрахунок його початкового об'єму. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме: $V_{роб.2} = V_{пм1} \cdot (1 + E_{\phi}) = 0,605 \cdot 1,1 \approx 0,67 \text{ м}^3$

Об'єм інокуляту $0,67 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення 0,55 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 0,67/0,55 = 1,22 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст2} = 1,25 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з2} = 0,67/1,25 = 0,54$. Перевірений коефіцієнт заповнення знаходиться в діапазоні 0,55-0,65 це характерно для аеробних процесів, можна зробити висновок, що геометричний об'єм посівного апарату визначено правильно.

Кількість посівного матеріалу, необхідного для посівного апарату, складає 10% від об'єму живильного середовища. Отже, для засіву $V_{роб.2} = 0,67 \text{ м}^3$ необхідно приготувати $V_{пм2} = V_{роб.2} \cdot X_{\phi} = 0,67 \cdot 0,1 = 0,067 \text{ м}^3$ посівного матеріалу, де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм}2} = 0,67 - 0,067 = 0,603 \text{ м}^3$$

Оскільки під час отримання 67 літрів ($0,067 \text{ м}^3$) посівного матеріалу через систему вентиляції втрачається близько 10% культуральної рідини у вигляді крапель.

Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме: $V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм}2} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 0,067 \cdot 1,1 \approx 0,07 \text{ м}^3$

Об'єм інокуляту $0,07 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення $0,55$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па}2} = 0,07 / 0,55 = 0,127 \text{ м}^3 = 130 \text{ л}$. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст}3} = 125 \text{ л}$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 70 / 125 = 0,56$. Перевірений коефіцієнт заповнення знаходиться в діапазоні $0,55-0,65$ це характерно для аеробних процесів, робимо висновок, що геометричний об'єм посівного апарату визначено правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 70 л необхідно:

$V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб.3}} \cdot X_{\text{ф}} = 70 \cdot 0,1 = 7 \text{ л}$ посівного матеріалу, де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пм}3} = 70 - 7 = 63 \text{ л}$$

Оскільки під час процесу отримання 7 л інокуляту частина культуральної рідини втрачається внаслідок краплевиносу (близько 10%), тому необхідно скоригувати розрахунок його початкового об'єму.

Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме: $V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм}3} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 7 \cdot 1,1 = 7,7 \text{ л}$

Об'єм інокуляту $7,7 \text{ л}$ за коефіцієнта заповнення $0,55$ можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{\text{ін}2} = 7,7 / 0,55 = 14 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{ст}4} = 12 \text{ л}$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,4} = 7,7 / 12 = 0,64$. Перевірений коефіцієнт заповнення знаходиться в діапазоні $0,55-$

0,65 характерному для аеробних процесів, робимо висновок, що геометричний об'єм посівного апарату визначено правильно.

Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пм4}} = 7,7 - 0,77 = 6,93 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати $V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} \times X_{\text{ф}} = 7,7 \cdot 0,1 = 0,77 \text{ л}$, де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм4}} = 0,77 \text{ л}$ (770 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням в колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить: $N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 770 / (750 \times 0,2) = 6 \text{ колб}$.

3.6. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу курдлану *Trichoderma harzianum* GIM 3.442

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 5 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{\text{роб.1}} = 6,05 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} \cdot X_{\text{ф}} = 6,05 \cdot 0,05 = 0,303 \text{ м}^3$ посівного матеріалу, де $X_{\text{ф}} = 0,05$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Оскільки в процесі отримання інокуляту 10 % культуральної рідини втрачається внаслідок краплевиносу, тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме: $V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \cdot (1 + E_{\text{ф}}) = 0,303 \cdot 1,1 \approx 0,33 \text{ м}^3$

Об'єм інокуляту $0,33 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення $0,55$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 0,33 / 0,55 = 0,6 \text{ м}^3$. Беремо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст2}} = 0,63 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{\text{з2}} = 0,33 / 0,63 = 0,52$.

Кількість посівного матеріалу, необхідного для посівного апарату, складає 5% від об'єму живильного середовища. Отже, для засіву $V_{роб.2} = 0,33$ м³ необхідно приготувати $V_{пм2} = V_{роб.2} \cdot X_{ф} = 0,33 \cdot 0,05 = 0,017$ м³ посівного матеріалу, де $X_{ф} = 0,05$ – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:
 $V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 0,33 - 0,017 = 0,313$ м³

Оскільки під час отримання 17 літрів (0,017 м³) посівного матеріалу через систему вентиляції втрачається близько 10% культуральної рідини у вигляді крапель.

Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме: $V_{роб.3} = V_{пм2} \cdot (1 + E_{ф}) = 0,017 \cdot 1,1 \approx 0,019$ м³

Об'єм інокуляту 0,019 м³ за коефіцієнта заповнення 0,55 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 0,019 / 0,55 = 0,034$ м³ = 34 л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст3} = 30$ л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 19 / 30 = 0,63$.

Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 19 л необхідно:

$V_{пм3} = V_{роб.3} \cdot X_{ф} = 19 \cdot 0,05 = 0,95$ л посівного матеріалу, де $X_{ф} = 0,05$ – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:
 $V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 19 - 0,95 = 18,05$ л

Одержання посівного матеріалу $V_{пм4} = 0,95$ л (950 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням в колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить: $N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 950 / (750 \times 0,2) = 7$ колба.

Таблиця 3.2

**Розрахунки середовища, інокуляту та обладнання для синтезу
курдлану**

№ стадії	Тип апарата	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}, м^3$	Коефіцієнт заповнення, K_3 , частка	Робочий об'єм апарата $V_{роб}, м^3$	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}, м^3$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}, м^3$	Найближчий об'єм апарата, $м^3$
1	2	3	4	5	6	7	8
5	Ферментер	10	0,55	6,05	5,45	0,605	10
Вирощування інокуляту <i>Agrobacterium sp. ATCC 31749</i>							
4	Інокулятор	1,25	0,55	0,67	0,603	0,067	1,25
3	Інокулятор	125 л	0,55	0,07	63 л	7 л	125 л
2	Інокулятор	12 л	0,55	7,7 л	6,93 л	0,77 л	12 л
1	Колби, шт	750 мл	0,2	-	770 мл	-	5 шт
Вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum GIM 3.442</i>							
3	Інокулятор	0,63	0,55	0,33	0,313	0,017	0,63
2	Інокулятор	30 л	0,55	0,019	18,05 л	0,95 л	30 л
1	Колби, шт	750 мл	0,2	-	950 мл	-	6 шт

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму глюкози у *Agrobacterium sp.* ATCC 31749

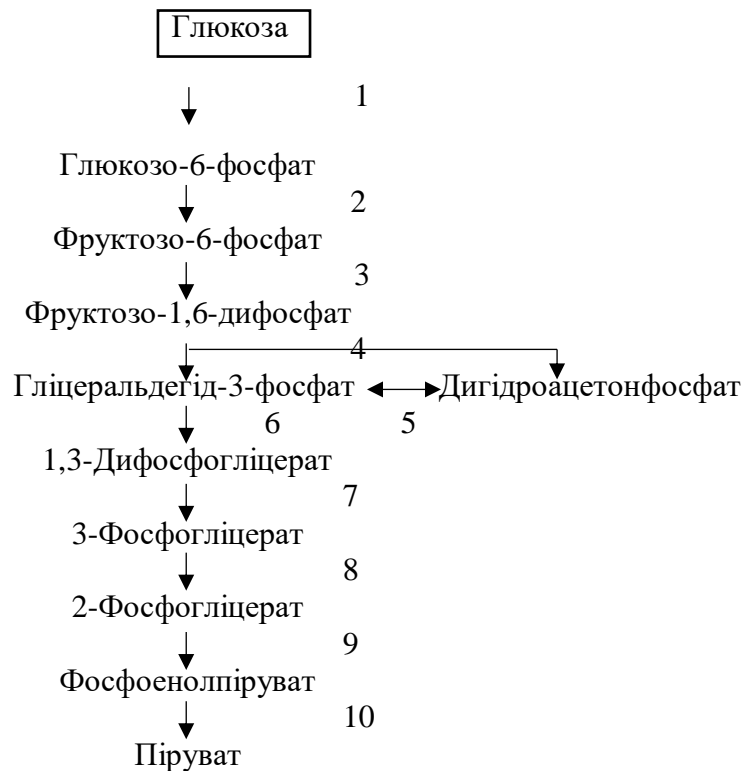
У поживному середовищі для культивування продуцента курдлану *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 джерелом вуглецю є глюкоза [17].

Користуючись Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ми бачимо, що у *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 інформація відсутня, тому ми беремо інформацію про *Agrobacterium tumefaciens* S33, у нього катаболізм відбувається шляхом гліколізу. [18]

Гліколіз у *Agrobacterium tumefaciens* S33 відбувається за участю таких ферментів: глюкоза, за допомогою ферменту гексокінази (КФ 2.7.1) перетворюється на глюкозо - 6 - фосфат. Глюкозо - 6 – фосфат перетворюється на фруктозо - 6 - фосфат за участю глюкозофосфатізомерези (КФ 5.3.1.9). Фруктозо - 6 - фосфат під дією фосфоглікокінази (КФ 2.7.1.11) перетворюється на фруктозо - 1,6 - дифосфат. Фруктозо - 1,6 – дифосфат перетворюється на гліцеральдегід - 3 – фосфат з допомоги фруктозодифосфаталядолази (КФ 4.1.2.13). Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12) каталізує синтез 1,3 - Дифосфогліцерату. 1,3-Дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3 - Фосфогліцерат. 2 - Фосфогліцерату, утворюється під дією фосфогліцератмутаци (КФ 5.4.2.12). 2 - Фосфогліцерат, за участі фермента енолази (КФ 4.2.1.11) перетворюється на Фосфоенолпіруват. Завершальний етап метаболічного шляху є утворення пірувату, що каталізується піруваткіназою (КФ 2.7.1.40)

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Старінський С.В.			Літ.	Арк.	Архів
Перевір.		Резніченко Ю. М.				31	100
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н.Контр							
Затверд.		Стабніков В. П.					

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ
ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ



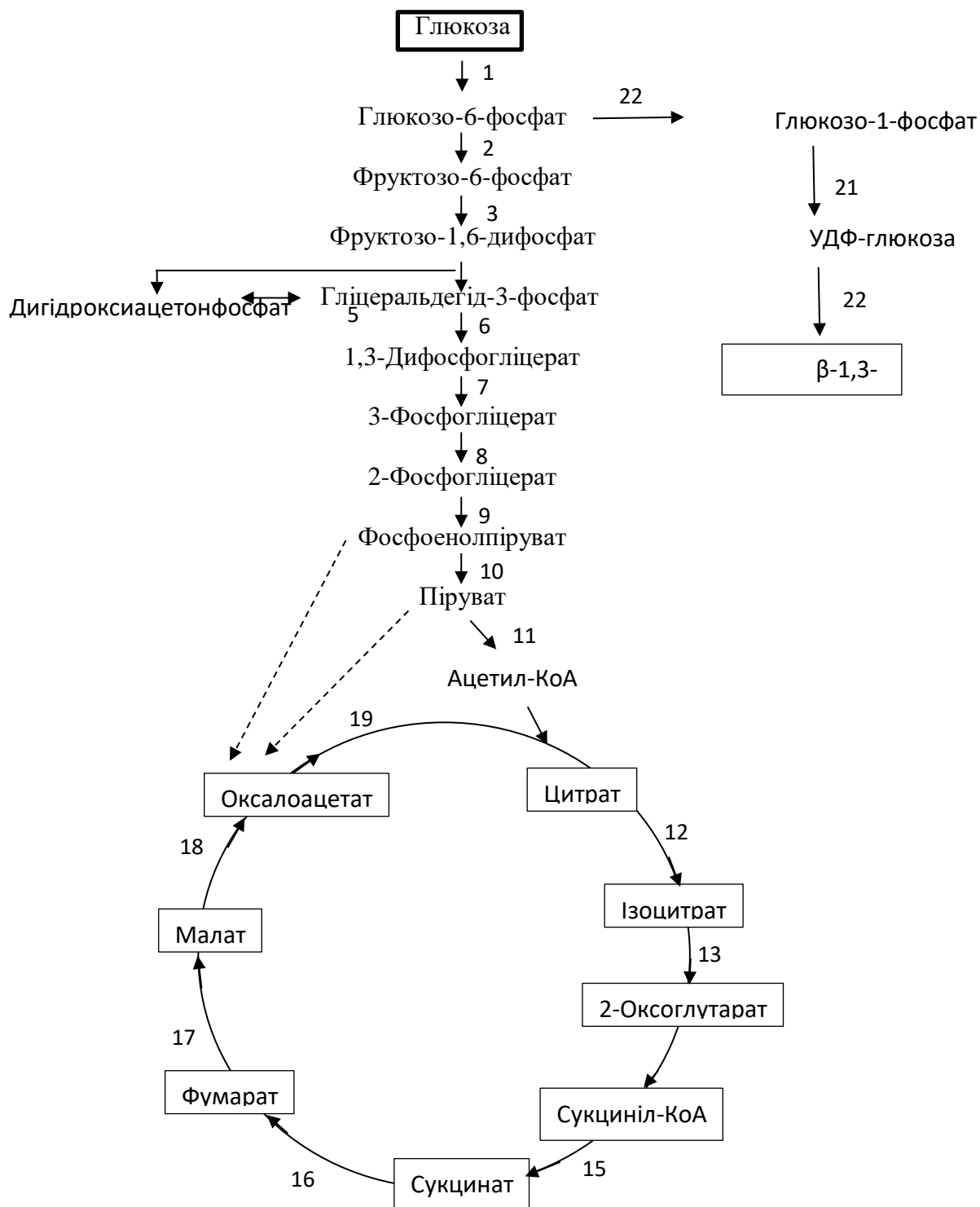
Катаболізму глюкози у *Agrobacterium tumefaciens* S33

Ферменти: 1-Глюкокіназа (КФ 2.7.1.2.); 2- Глюкозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3- Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4- Фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5-Трифосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6- Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7- Фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8- Фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 9- Енолаза (КФ 4.2.1.11); 10- Піруваткіназою (КФ 2.7.1.40).

4.2. Шлях катаболізму ростового субстрату у продуцента курдлану

Глюкоза є ростовим субстратом для біосинтезу курдлану штамом *Agrobacterium sp.* ATCC 31749. Інформація у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня. Тому я посилаюсь на наукову статтю. Глюкоза (джерело вуглецю) перетворюється на піруват у гліколізі [16]. Потім піруват під дією піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1) перетворюється на ацетил-КоА, він залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Під дією фосфоглюкомутази Глюкозо-6-фосфат перетворюється у Глюкозо-1-фосфат. Глюкозо-1-фосфат целобіофосфорилазою перетворюється на УДФ-глюкозу,

яка в свою чергу за допомогою β -1,3-глюкансинтази перетворюється на попередника курдлану.[19]



Ферменти: 1 - Глюкокіназа (КФ: 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфоглюкокіназа 2 (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40). 11- ферредоксиноксидоредуктаза (КФ 1.2.7.1); 12 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 2.3.1.61); 16 – сукциніл-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.5); 17 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 18 – фумаратгідратаза (КФ

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

1. Вирощування інокуляту і промислове культивування відбувається при температурі 30°C [8]. В таких температурних рамках є ризик забруднення мікроорганізмами, що ростуть у нейтрофільному/мезофільному температурному діапазонах. Тому під час росту і біосинтезу потрібно підтримувати асептичні умови (стерильність обладнання, середовищ)

2. Промисловий біосинтез курдлану можна проводити періодичним або безперервним способами. Тому що, максимальний рівень синтезу полісахариду спостерігається у стаціонарній фазі росту, хоча курдлан синтезується протягом всього росту мікроорганізму, вихід цільового продукту при виборі безперервного способу культивування буде знижуватися. Тому краще обрати періодичний тип культивування.

3. Глибинний спосіб культивування мікроорганізму є більш привабливим, тому що тоді кількість відходів є мінімальною і складові середовища культивування споживаються майже повністю.

4. У процесі одержання посівного матеріалу, починаючи із культивування в колбах і закінчуючи культивуванням в 10 м³ ферментері, концентрація глюкози у середовищі (згідно зі статті [8]) складає – 80,00 г/л. Відповідно до інформації, наведеної у статті [8], тривалість культивування складає 72 год. Тому перша порція глюкози (40 г/л) буде вноситися на початку виробничого біосинтезу, а інша частина – порційно кожні 18 год дозами концентрацією 10 г/л.

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Старінський С.В.			Літ.	Арк.	Архів
Перевір.		Резніченко Ю. М.				35	100
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н.Контр							
Затверд.		Стабніков В. П.					
					РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		

Отже, вирощування і біосинтез курдлану здійснюється в аеробних умовах періодично без підживлення, глибинним способом із дотриманням стерильності виробничого процесу.

Вибір типу ферментера для культивування *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 – продуцентів курдлану

Вибір оснащення ферментера залежить від фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізму та умов, у яких буде протікати культивування. Вище було зазначено, що культивування продуцента буде здійснюватися глибинним способом, отже необхідно вибрати комплектуючі ферментеру, щоб забезпечити стабільне дотримання умов вирощування і біосинтезу:

- кожен із біологічних агентів – обраної змішаної культури є аеробом, тому ферментер повинен бути обладнаний барботером для насичення поживного середовища киснем на необхідному для біосинтезу рівні та містити газоаналізатор для контролю концентрації CO₂;

- ферментація триває при нейтральному рН 6,5-7,0 [8], отже ферментер має бути обладнаний датчиком для контролю рівню рН;

- щоб здійснювати масообмін, ферментер має бути обладнаний перемішувальною мішалкою відкритого типу, в якій можна регулювати кількість обертів;

- ферментер має бути обладнаний сорочкою і датчиком температури, для підтримки сталої температури на рівні 30 °С.

Для вирощування інокуляту і біосинтезу курдлану пропонується обрати ферментери компанії Solaris (США). Компанія виробляє ферментери об'ємами від 5-30000 л із можливістю встановлення датчиків контролю швидкості роботи мішалки, рівнів CO₂ та O₂, провідності, густини культуральної рідини, температури, тиску, рН і систем CIP/SIP – автоматичної мийки та стерилізації [20].

5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Продуценти *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM є облигатним аеробом і факультативним анаеробом відповідно, тому потрібно забезпечити підтримку аераційного повітря. Очищення аераційного повітря є дуже важливим етапом для забезпечення ефективності процесу.

Стадії очищення аераційного повітря[21]:

- Для збору атмосферного повітря використовують вертикальну трубу з повітрозабірником. Повітря забирається з верхньої частини труби, розташованої на 2-3 метри вище найвищої точки будівлі.
- Грубе очищення повітря від пилу з розміром частинок більше 50 мкм відбувається на спеціальних тканинних фільтрах.
- Внаслідок стиснення повітря в компресорах і турбоповітродувках відбувається підвищення температури повітря до 120-200°С.
- За допомогою теплообмінників стиснене повітря охолоджують до температури, за якої водяна пара переходить в конденсат.
- Видалення конденсату за допомогою ресивера.
- Забезпечення стабільних значень тиску та температури шляхом підігріву робочого середовища паром в теплообмінниках до 45-50°С.
- Головні фільтри, призначені для попередньої стерилізації, використовують фільтрувальні матеріали з високою термостійкістю. Найчастіше це перхлорвінілові волокна, здатні витримувати температуру до 70°С. Вибір матеріалу залежить від конкретних умов експлуатації та вимог до ефективності фільтрації.
- Далі, повітря направляється до індивідуальних фільтрів, розташованих безпосередньо на ферментерах, де очищення доводиться до 99,99%.

5.3 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Важливість санітарної обробки на початку і в кінці кожного циклу виробничого процесу не можна недооцінювати. Це одна із дуже важливих

критичних допоміжних стадій, яке серйозно впливає на процес біотехнологічного виробництва, так як залишки навіть незначного забруднення, матимуть фатальний вплив на якість готового продукту. Тому від персоналу вимагається суворо дотримуватися і виконувати встановлений комплекс процедури по очистці і дезінфекції, для максимальної мінімізації ризику забруднення готового продукту чужорідною мікрофлорою, або іншими речовинами і субстанціями за рахунок перехресної контамінації.

Цей комплекс процедур на практиці реалізується за допомогою мийки виробничого обладнання і поверхонь мийними засобами та виконання фінішної дезінфекції. Мийні засоби - це органічні, або неорганічні речовини, що володіють мильними або поверхнево-активними властивостями. Дезінфекція це набір процедур, за допомогою яких ліквідують патогенні, або умовно-патогенні мікроорганізми, форми їх спокою. Щоб бути на 100 % впевненими у якості виконання санітрано-гігієнічної підготовки мийка і дезінфекція завжди виконуються комплексним етапом, це гарантує стабільний випуск високоякісної готової продукції.

Оскільки виробничі поверхні контактують із речовинами різної хімічної природи, які не завжди легко видаляються і це може стати джерелом розвитку мікрофлори або хімічного забруднення, тому мийні і дезінфікуючі засоби повинні володіти таким спектром властивостей як:

- бути швидко розчинними у воді;
- не впливати на здоров'я працівників;
- легко і швидко видаляти забруднення різноманітної природи;
- не впливати на фізичний стан (пошкоджувати) оброблюваних поверхней;
- не впливати на зовнішній вигляд, склад і властивості готового продукту;

- бути високоактивними на достатній проміжок часу для знищення широкого діапазону мікроорганізмів;

Під час виробничого процесу біосинтезу курдлану можна використовувати такі найменування миючих і дезінфікуючих засобів:

Стериллін (Sterillin) – спиртовий дезінфектант для рук, він захищає шкіру. Має широкий спектр антимікробної дії; знижує кількість транзиторної флори більш ніж на 99,99% за 30 секунд дезінфекція рук може проводитися в будь-якому місці, незалежно від наявності умивальника і води. Склад: 2-пропанол, 1-пропанол, мецетроний етилсульфат (INN), зволожуючі добавки. Не пересушує шкіру рук і тіла, гіпоалергенний, рН нейтральний [22].

Handychem QV – рідке мило з дезінфікуючою дією, легко розчиняється у воді, сильно пінниться. Склад: катіонний тензид, неіонний тензид, компонент, що захищає шкіру. Засіб використовується в усіх сферах діяльності, де важливо підтримувати відповідний мікробіологічний стан. Відмінно очищає та дезінфікує. Має бактерицидні, фунгіцидні властивості, а також ефективно вбиває туберкульозну паличку [23].

Сода каустична – або гідроксид натрію, є ефективним засобом для очищення і видалення жирових забруднень. Високо розчинна у воді та володіє сильними лужними властивостями, відмінна мильна консистенція, висока гігроскопічність, що дозволяє розкладати органічні речовини, жири та білкові сполуки. Використовується для миття усередині обладнання, трубопроводів [24].

Миючий засіб САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ – має основу з аніонних, амфотерних і неіоногенні ПАР, призначений для миття і видалення забруднень. Склад: консервант, ароматизатор, неіоногенні ПАР, аніонні ПАР, амфотерні ПАР, комплексонат, вода. Рідина від безбарвного до коричневого кольору. Ефективно видаляє з поверхонь і не фіксує на них різноманітні органічні (у т.ч. біологічні рідини), неорганічні та комбіновані забруднення.

Засіб використовують у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,1% до 10,0% [25].

Миючий засіб LIV актив 132– лужний мийний засіб який має сильні піноутворюючі властивості. Призначений для генерального, періодичного, повсякденного прибирання, миття відкритих поверхонь із нержавіючої сталі в різних галузях харчової промисловості (резервуари, змішувачі, розливні машини, ємності, конвеєри, трубопроводи, технологічні столи, санітарно-технічне обладнання, стіни та підлоги із кахелем). Ефективний при видаленні жирових забруднень та нагару, органічних забруднень різноманітної природи, пігментів. Склад: вода деіонізована, гідроксид натрію, гідроксид калію, неіоногенні ПАР, комплексоутворювач, аніонна ПАР. Легована сталь, гума та лугостійкі пластмаси, хромонікелеві сплави не руйнуються під впливом засобу. Для миття використовувати розчини у концентрації 3,0-8,0 % [26].

Дезінфікуючий засіб для поверхонь НЕОПРИМ– безбарвна прозора рідина. Склад: етанол, 2-пропанол, гліцерин, вода. Непошкоджує оброблювані поверхні із сталі, металів, гуми, пластика. Засіб має бактерицидну дію проти грам + і грам- бактерій збудників кишкових і крапельних інфекцій (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, мультирезистентного стафілокока (MRSA), синьогнійної палички (*Pseudomonas aeruginosa*), *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus spp*, *Streptococcus spp*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, бактерій родів *Klebsiella spp*) і фунгіцидну дію (грибів роду *Кандида*, *Трихофітон* і *Aspergillus niger*). IV клас небезпеки при введенні в шлунок і нанесенні на шкіру. Використовувати розчини у концентрації 2,0-5,0 % [27].

Дезінфікуючий засіб DEZALDUM 20 – являє собою прозору безбарвну рідину зі слабким запахом. Склад: вода підготовлена, бензалконію хлорид, глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутворювач.

Засіб ефективний проти таких видів патогенних мікроорганізмів:

- патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми (кишкова паличка, бруцели, клостридії, стрептококи, стафілококи, сальмонели і ін.);
- мікобактерії туберкульозу;
- коронавіруси людини, в тому числі SARS-CoV-2, що викликає COVID-19;
- вірусу поліомієліту; вірусу імунодефіциту людини;
- вірусу кору; коро- і аденовірусів; ротавірусів; герпесу;
- гепатитів А, В, С, D; патогенних грибів Кандида і Трихофітон; пліснявих грибів.

Використовувати розчини у концентрації 0,5-3,0 % [28].

Використовуючи вищенаведені миючі і дезінфікуючі засоби, можна якісно налагодити санітарну обробку для забезпечення біотехнологічного виробництва з метою отримання якісної кінцевої продукції.

Узагальнена характеристика мийних та дезінфікуючих засобів

Таблиця 5.1.

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Стериллин (Sterillin) (ТОВ "Золотоніський лікєро-горілчаний завод "Златогор", Україна)	пропанол, 1-пропанол, мететроний етилсульфат (INN), зволожуючі добавки	бактерицидні, фунгіцидні та віруліцидні властивості	Засіб для дезінфекції рук	-	-	Наказ від 13.05.2021 №921 До 13.05.2026	371,5 грн за 1 л	[22]
Handychem QV («Глобал Хім Україна», Україна)	алкїлдиметилбензиламоній хлорид 1%)		Засіб для дезінфекції рук	-	-	Наказ від 01.02.2021 №152 До 01.02.2026	1268 грн за 5 кг	[23]
Сода каустична	Гідрооксид натрію	-		Толерантний до поверхонь з лудженого заліза, алюмінію, скла, гуми (в т. ч. силіконової), нержавіючої сталі (в т. ч. хромової, хромонікелевої, аустенітної), кислотостійких пластмас (в т. ч. поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид), фторопласту (тефлон, вірон), кераміки та поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з емалі, гуми	Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 2-3 %.	Не потребує реєстрації	105 грн за 1 кг	[24]
САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ (виробник: ІНТЕРДЕЗ (Україна))	аніонні ПАВ, амфотерні ПАВ, консервант, ароматизатор, неіоногенні ПАВ, комплексонат, вода	-	засіб на основі аніонних, амфотерних і неіоногенні ПАВ. Рідина від безбарвного до коричневого кольору. Ефективно видаляє з поверхонь і не фіксує на них різноманітні органічні (у т.ч. біологічні рідини), неорганічні та		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0,1-10,0%.	Не потребує реєстрації	50,4 грн за 1 л	[25]

			комбіновані забруднення					
LIV Актив 132 (виробник: Квант)	вода деіонізована, гідроксид натрію, гідроксид калію, неіоногенні ПАР, комплексоутвор ювач, аніонна ПАР	-	лужний мийний засіб із сильними піноутворюючими властивостями		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 3,0- 8,0 %.	Не потребує ресстрації	1048 грн за 20 л	[26]
НЕОПРИМ (виробник:: BALTIACHEM I (Естонія))	етанол, 2- пропанол, гліцерин, вода		безбарвна прозора рідина		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 2,0% - 5,0%.	Наказ від 26.04.2021 №819 до 26.04.2026	1380,0 грн за 5 л	[27]
DEZALDUM 20 (виробник: Інтродез)	вода підготовлена, бензалконію хлорид, глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутвор ювач.	Засіб володіє бактерицидною (в т. ч. туберкулоцидною), віруліцидною (включаючи поліовірус), фунгіцидною (в тому числі щодо дріжджових і цвілевих грибів) і спороцидною діями	прозора безбарвна або жовтуватого кольору рідина зі слабким запахом		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0, 5% - 3,0%.	Наказ від 04.01.2021 №3 до 04.01.2026	948 грн за 5 л	[28]

5.3.1. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва курдлану

Курдлан шляхом промислового культивування для задоволення річної потреби виробляється протягом 290 днів. Виробництво передбачає підготовку та використання інокуляторів на 12 л, 30 л, 125 л, 1250 л та ферментеру 10 000 л, реакторів-змішувачів для поживного середовища, машину для автоматичного перемішування колб, лабораторного боксу.

Крім обладнання, необхідні лабораторні та виробничі приміщення: мікробіологічна лабораторія (зберігання робочої культури, бокси для роботи із культурою продуцента, виконання операцій контролю якості), приміщення із установкою для автоматичного перемішування колб-качалок для вирощування продуцента у формі інокуляту, приміщення із промисловими інокуляторами, приміщення для промислового біосинтезу курдлану. Обладнання у приміщеннях розмістимо на дистанції 1,5 м від стін та 1,0 м одне від одного. Перелік обладнання із розмірами наведено у *табл. 2.1*. Як видно із даних, загальний об'єм обланання становить 18 487 л.

Знайшовши загальним об'єм можна визначити кількість мийних та дезінфікуючих засобів, базуючись на розмірах робочих приміщень.

На *рис. 5.1* схематично зображено приміщення, де відбувається виробництво культуральної рідини *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 та *Trichoderma harzianum* GIM 3.442.

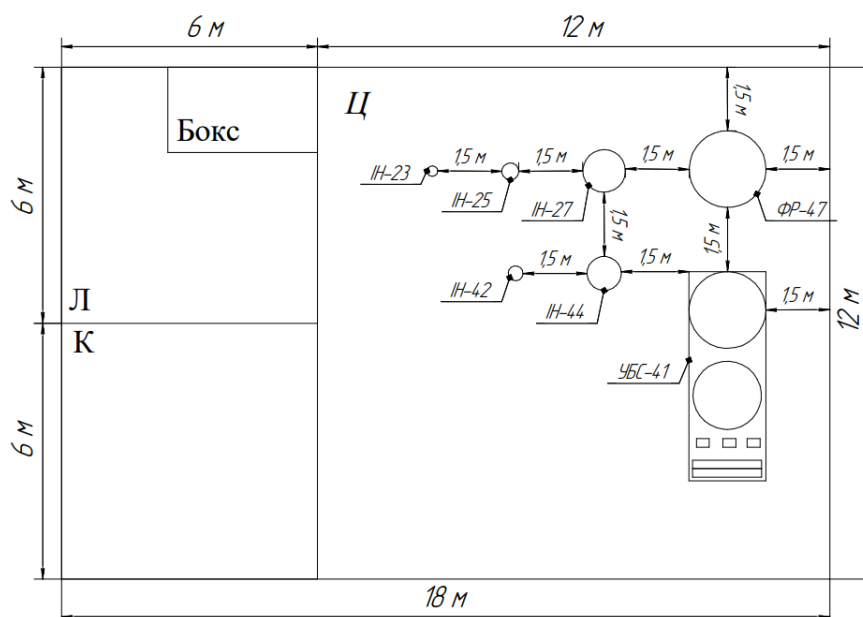


Рис. 5.1. План приміщення для виробничого культивування *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 та *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 з метою отримання курдлану. Ц - цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту: ІН-23 – інокулятор 12 л; ІН-25 – інокулятор 125 л; ІН-27 – інокулятор 1250 л; ІН-42 – інокулятор 30 л; ІН-44 – інокулятор 630 л; ФР-47 – ферментер 10 м³; УБС-41- установка безперервної стерилізації 5м³, Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками.

Згідно даних представлених на *рис 5.1*, визначимо площі виробничих приміщень. Врахуємо факт миття підлоги - 290 разів, а також кількість генеральних прибирань (2 рази на місяць) – в загальному це 20 разів. Кількість миючих засобів для обробки стін і підлоги розраховано далі по тексту.

Розміри обладнання, що необхідне для виробництва курдлану

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	12	0,2	0,24
Інокулятор	30	0,35	0,312
Інокулятор	125	0,4	0,99
Інокулятор	630	0,8	1,25
Інокулятор	1250	1,0	1,59
Ферментер	10 000	1,8	3,93
Реактор змішувач	5	0,119	0,45
Реактор змішувач	15	0,2	0,48
Реактор змішувач	15	0,2	0,48
Реактор змішувач	15	0,2	0,48
Реактор змішувач	15	0,2	0,48
Реактор змішувач	25	0,3	0,35
Реактор змішувач	50	0,4	0,39
Реактор змішувач	250	0,75	0,57
Реактор змішувач	150	0,5	0,76
Реактор змішувач	400	0,65	1,2
Реактор змішувач	500	0,48	1,15
УБС	5000	1,8	1,74
Всього	18 487	-	-

Згідно із *рис. 5.1*, враховуючи висоту приміщень 12 м, площа підлоги приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу складає 144 м² (12 м × 12 м), площа стін – ((12 м × 2,5 м) × 2 + (12 м × 2,5 м)) × 2 = 120 м², загальна площа – 144 м² + 120 м² = 264 м². Для мікробіологічної лабораторії площа підлоги складає 6 м × 6 м = 36 м², площа стін – ((6 м × 2,5 м) × 2 + (6 м × 2,5 м)) × 2 = 60 м², загальна площа – 96 м². Для приміщення з качалками площа підлоги складає 6 м × 6 м = 36 м², площа стін – ((6 м × 2,5 м) × 2 + (6 м × 2,5 м)) × 2 = 60 м², загальна площа – 96 м².

Узагальнені дані по площі поверхонь для обробки миючими засобами вказано в *табл. 5.3*.

Розрахунок площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу	144	120	264
Мікробіологічна лабораторія	36	60	96
Приміщення з качалками	36	60	96
Разом	216	240	456

Далі проведемо розрахунок періодичності миття обладнання. Загальний об'єм культуральної рідини становить 230,58 м³, а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює 5,5 м³/цикл, то кількість виробничих циклів (циклів миття) становить: 230,58 м³ / 5,5 м³/цикл = 42 цикли. Враховуючи додаткове миття після останнього циклу, сумарна кількість буде становити 43. Тоді загальний об'єм миття:

$$18,487 \times 43 = 794,9 \text{ м}^3$$

Розрахунок площ миття / дезінфекції

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м ² / м ³	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, м ² / м ³
Обладнання	18,487 м ³	43	794,9 м ³
Підлога	216 м ²	290	62 640 м ²
Стіни, двері, вікна	240 м ²	20	4 800 м ²

Так як витрати робочого розчину засобу становлять 100 мл на 1 м² на площі поверхні, об'єми робочих розчинів мийних / дезінфікуючих засобів можна розрахувати наступним чином. Згідно із даними із *табл 2.3*, об'єм миття

обладнання складає 18,487 м³. Для скорочення витрат використовують СІР-мийки. Витрати при цьому робочих розчинів складають 20-30%. Тому для одного циклу миття знадобиться: $18\,487\text{ л} \times 0,3 = 5546,1\text{ л}$ робочого розчину миючого засобу, а на весь період виробничого процесу: $5546,1\text{ л} \times 43 = 238\,482\text{ л}$. Загальна площа всіх поверхонь складає: $62\,640\text{ м}^2 + 4\,800\text{ м}^2 = 67\,440\text{ м}^2$, а загальна витрата миючого / дезінфікуючого розчинів становить: $67\,440\text{ м}^2 \times 100\text{ мл} = 6744\text{ л}$. Інформація по вартості мийних і дезінфікуючих засобів, а також їх витрати представлено у *табл. 5.5*.

Витрати і вартість мийних / дезінфікуючих засобів під час виробництва курдлану

Назва	Склад	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м ³ /м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття /дезінфекції під час виробництва, грн
Сода каустична ¹	Гідроксид натрію	2,0 %	Обладнання	18,487	168 388	105,0	2,1	353 615
САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ ²	аніонні ПАР, амфотерні ПАР, консервант, ароматизатор, неіоногенні ПАР, комплексонат, вода	5,0 %	Обладнання	18,487	168 388	50,4	2,52	424 338
LIV Актив 132 ³	вода деіонізована, гідроксид натрію, гідроксид калію, неіоногенні ПАР, комплексоутворювач, аніонна ПАР	8,0 %	Обладнання	18,487	168 388	52,4	4,2	707229
НЕОПРИМ ⁴	етанол, 2-пропанол, гліцерин, вода	5,0 %	Обладнання / Стіни/підлога/ вікна	67 440	6152	276,0	13,8	84 898
DEZALDUM 20 ⁵	вода підготовлена, бензалконію хлорид, глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутворювач.	3,0%	Обладнання / Стіни/підлога/ вікна	67 440	6152	189,6	5,67	34 882

Примітка. Вартість засобів наведено станом на квітень 2025 р. 1- <https://xn--80abmqjziir9e.com.ua/ua/p38538213-liv-sredstvo-dlya.html> 2-https://hozka.ua/ua/liv-aktiv-132-sredstvo-mojushhee-shhelochnoe-pennoe40074?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=pmax_first&utm_content=&utm_term=&gad_source=1&gbraid=0AAAAA95HFHLYi8r0y7nnOf53RrPkVntlG&gclid=Cj0KCQjw5azABhD1ARIsAA0WfUH1B53jmXZY_PMSrrignXXnIzDwctwepjl67InAXoasxH4xDU6AiYaAv0VEALw_wcB 3- <https://interdez.com.ua/product/baltiachemi-neoprim> 4 – <https://atma.ua/profesijna-himiya/dezynfektsiya/zasib-dezynfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-5l-da015000/>

* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «LIV Актив 132³»:** Ціна 1 л становить 52,4 грн, концентрація його робочого розчину – 8,0 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 8,0 мл (0,08 л) концентрату. Таким чином вартість 8,0 % розчину становить: 52,4 грн × 0,08 л = 4,2 грн/л.

5.4 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 – продуцентів курдлану

Для промислового отримання курдлану змішаною культурою використовується середовище такого складу [8](г/л):

- Глюкоза – 80,00;
- дріжджовий екстракт – 1,00;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,00;
- KH_2PO_4 – 3,00;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,50;
- рН 6,5-7,0

При підготовці посівного матеріалу склад поживного середовища наступний *Agrobacterium sp.* ATCC 31749

- Глюкоза – 20,00;
- дріжджовий екстракт – 10,0;
- KH_2PO_4 – 1,74;
- MgSO_4 – 0,50;

При підготовці посівного матеріалу склад поживного середовища наступний *Trichoderma harzianum* GIM 3.442

- Глюкоза – 20,00;
- дріжджовий екстракт – 15,00;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,50;
- KH_2PO_4 – 6,00;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,80;

При підготовці посівного матеріалу останньої стадії склад поживного середовища наступний *Trichoderma harzianum* GIM 3.442

- пшеничні висівки – 20,00;
- пахімаран – 20,00;
- KH_2PO_4 – 5,00;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,50;

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 10 м³.

Одержання інокуляту *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 відбувається у чотири етапи - у колбах на качалці, у інокуляторі об'ємом 12 л, 125 л і 1,25 м³. Одержання інокуляту *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 відбувається у три етапи - у колбах на качалці, у інокуляторі об'ємом 30 л і 630 л відповідно.

Стерилізацію поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах буде здійснювати в автоклаві, для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу – безпосередньо в самих апаратах при рН 4 – 4,5, щоб не допустити утворення нерозчинного осаду. Також необхідно у технологічній схемі врахувати відповідні допоміжні роботи (підготовку 6%-го розчину HCl і 6%-го розчину NaOH).

Далі треба провести розрахунок скільки соляної кислоти і лугу необхідно для приготування середовища на кожну із стадій виробництва і кількість та об'єми тари і реакторів. Оскільки об'єм ПС для виробничого біосинтезу складає 5,45 м³, задля оптимізації виробничого процесу, буде встановлено установку безперервної стерилізації (УБС) об'ємом 5 м³.

Вирощування інокуляту в колбах на качалках *Agrobacterium* sp. ATCC 31749

Склад поживного середовища, ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 20-30 хв).

Композиція Б: KН₂РO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: MgSO₄ (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо через ризик утворення осадів.

Глюкозу, пшеничні висівки та дріжджовий екстракт стерилізують окремо від солей, оскільки вони є термолабільними. Стерилізацію композицій А, Б, В здійснюють в автоклаві.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного Середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 770 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,0	15,4	А	0,4 л
Дріжджовий екстракт	10,0	7,7		
Вода	0,4 л			
КН ₂ РО ₄	1,74	1,34	Б	0,1 л
Вода	0,1 л			
MgSO ₄	0,5	0,4	В	0,27 л
Вода	0,27 л			
Усього				0,77 л

Вирощування інокуляту в колбах на качалках *Trichoderma harzianum*

Проаналізувавши склад поживного середовища, ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: КН₂РО₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція В: (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ · 7H₂O (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного Середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 950 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,00	19	А	0,5 л
дріжджовий екстракт	15,00	14,25		
Вода	0,5 л			
КН ₂ РО ₄	6,00	5,7	Б	0,25 л
Вода	0,25 л			
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,50	2,38	В	0,2 л
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,8	0,76		
Вода	0,2 л			
Усього				0,95 л

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 12л, 125л та 1,25м³ *Agrobacterium sp.* ATCC 31749

Стерилізація 6,93, 63 та 603л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 20-30 хв)

Композиція Б: КН₂РО₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Глюкоза, дріжджовий екстракт (композиція А) подаються у спеціальні реактори, там розчиняються та стерилізуються. Компоненти композиції Б розчиняють в окремих реакторах, з яких потім вони будуть подані у відповідні посівні апарати, де буде проводитися стерилізація.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 12 л (Кз = 0,55)

Компонент поживного Середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,93 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,0	138,6	А	2,0 л
Дріжджовий екстракт	10,0	69,3		
Вода	2,0 л			
КН ₂ РО ₄	1,74	12,06	Б	4,93 л
MgSO ₄	0,5	3,5		
Вода	4,48 л			
Конденсат	0,45			
Усього				6,93 л

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 125 л ($K_3 = 0,55$)

Компонент поживного Середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 63,00 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,0	1260,0	А	20,0
Дріжджовий екстракт	10,0	630,0		
Вода	16,5 л			
Конденсат	1,65			
KH_2PO_4	1,74	109,62	Б	43,0
$MgSO_4$	0,5	31,5		
Вода	39 л			
Конденсат	3,9			
Усього				63,0 л

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,25 м³ ($K_3 = 0,55$)

Компонент поживного Середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 603,00 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,0	12,060 кг	А	200,0
Дріжджовий екстракт	10,0	6,030 кг		
Вода	165,4 л			
Конденсат	16,5			
KH_2PO_4	1,74	1049,22	Б	403,0
$MgSO_4$	0,5	301,5		
Вода	365,2 л			
Конденсат	36,5			
Усього				603,0 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л

Trichoderma harzianum GIM 3.442

Стерилізація 18,05 поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, тому потрібно переглянути композиції поживного середовища:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 20-30 хв)

Композиція Б: KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Глюкоза, дріжджовий екстракт (композиція А) подаються у спеціальні реактори, там розчиняється та стерилізується. Компоненти композиції Б розчиняють в окремих реакторах, з яких потім вони подаються у відповідні посівні апарати, де проводиться стерилізація.

Таблиця 5.11

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л ($K_3 = 0,55$)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 18,05 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20,00	361,0	А	10,0
дріжджовий екстракт	15,00	270,75		
Вода		8,5		
Конденсат		0,85		
KH_2PO_4	6,00	148,5	Б	8,05
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,50	61,9		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8	19,8		
Вода		7,1		
Конденсат		0,71		
Усього				18,05

**Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,63 м³
Trichoderma harzianum GIM 3.442**

Стерилізація 313л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: пшеничні висівки, пахімаран (режим стерилізації: 112 °С, 20-30 хв)

Композиція Б: КН₂РО₄, MgSO₄ ·7Н₂О, (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Пшеничні висівки, пахімаран (композиція А) подаються у спеціальні реактори, там розчиняється та стерилізується. Компоненти композиції Б розчиняють в окремих реакторах, з яких потім вони будуть подані у відповідні посівні апарати, де буде проводитися стерилізація.

Таблиця 5.12

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л (Кз = 0,55)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 313 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Пшеничні висівки	20,00	6,260 кг	А	200,0
Пахімаран	20,00	6,260 кг		
Вода		170,50		
Конденсат		17,0		
КН ₂ РО ₄	5,00	1565,0	Б	113,0
MgSO ₄ ·7Н ₂ О	0,50	156,5		
Вода		101,2		
Конденсат		10,1		
Усього			313,0	

Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³

Як попередньо було зазначено, середовище, необхідне для здійснення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10,0 м³, буде стерилізуватися в УБС. Тому немає потреби розділяти ПС на композиції:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 5-7 хв).

Таблиця 5.13

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в УБС

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,45 м ³ середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	80,00	436,0 кг	А	5450
дріжджовий екстракт	1,00	5,45 кг		
KH_2PO_4	3,00	16,4 кг		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,00	10,9 кг		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	8,18 кг		
Вода	4 521 л			
Конденсат	452,1 л			
Усього			5450	

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для створення кислого середовища з оптимальним рН передбачено використання 6% розчину соляної кислоти (HCl). Крім того, HCl є ефективним агентом для стерилізації фосфатів та основних солей, запобігаючи їх осадженню. З метою стабілізації рН після підкислення використовується 6% розчин гідроксиду натрію (NaOH).

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,77	–	–	–	–
6,93	13,92	у колбі на 100 мл	13,92	у колбі на 100 мл
63	126	у колбі на 250 мл	126	у колбі на 250 мл
603	1206	у колбі на 1,5 л	1206	у колбі на 2,5 л
0,95	–	–	–	–
18,05	36,1	у колбі на 100 мл	36,1	у колбі на 100 мл
313	626	у колбі на 1 л	626	у колбі на 1,5 л
5,45 м ³	10,9 л	У реакторі 15 л	10,9 л	У реакторі 15 л

Оскільки поживне середовище містить компоненти, які сприяють піноутворенню, зокрема, пшеничні висівки, а також необхідно підтримувати надання аераційного повітря, тому наш ферментер повинен бути оснащений піногасником.

На сьогоднішній день є піногасники на основі мінеральних і силіконових олій. Піногасники на основі мінеральних олій є дешевшими. Силіконовий піногасник – це універсальний засіб для контролю піноутворення. Його висока ефективність обумовлена унікальним поєднанням властивостей: висока поверхнева активність та хімічна стійкість. Силіконовий піногасник може використовуватися в різних галузях промисловості, де необхідне пригнічення піноутворення, незалежно від температури середовища та його хімічного складу. Кількість піногасника, що додається, залежить від інтенсивності піноутворення та може варіюватися від 0,1 до 2%. Ми будемо використовувати механічний піногасник. [29]

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

– приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 12, 30, 125, 630,0 л і 1,25 м³;

– приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівному апараті об'ємом 12, 30, 125, 630,0 л і 1,25 м³;

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник (Ресивер) В-2 ВКП«ГАЗСІЛЬБУД ЛТД» Температура повітря: від -60 до +180 °С Тиск до: 0,8 МПа[1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Повітряний фільтр касетний «ВЕНТ-ФІЛЬТР». Фільтрувальний матеріал: пенополіуретан; продуктивність: 3400 м ³ /год; Габаритні розміри: 592х592х292[2]
К-3	Компресор	1	Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR TRA-TM «Dalgakiran» Продуктивність: 2470 м ³ /год; Робочий тиск: 5-8 бар; Габаритні розміри: 3700×2000×2000 [3]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач повітря рефрижераторного типу DK 150 («Dalgakiran»). Продуктивність: 1628 м ³ /год; габарити, мм: 948х798х1460; потужність: 3,14 кВт [4]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер «Пневмотехніка» Об'єм 500л; Максимальний тиск: 11,5 бар; Габаритні розміри: 2110 х 600 [5]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач НКВ 500х300-2 («Vents»). Максимальний робочий тиск: 3,8 МПа; габаритні розміри, мм: 500х300х200 [6]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр повітряний касетний, клас фільтрації F9 «ВЕНТ-ФІЛЬТР» Фільтрувальний матеріал: поліестер; E>95% [7]
ІФ-24 ІФ-26 ІФ-28 ІФ-43 ІФ-45 ІФ-46	Індивідуальний фільтр	6	Фільтр повітряний SPF-005. Фільтруючий матеріал: активоване вугілля; діапазон температур: до 150 °С; ступінь очищення повітря фільтром: 99,99 % [8]

<p>НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ</p>				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Старінський С.В.		
Перевір.		Резніченко Ю. М.		
Реценз.				
Н.Контр				
Затверд.		Стабніков В. П.		
<p>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</p>				
		Літ.	Арк.	Архів
			60	100
<p>Кафедра БТМ</p>				

Продовження таблиці 6.1

РЗ-8	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% натрій гідроксиду	1	Реактор-змішувач SR-15 «Naagen & Rinau Німеччина» об'ємом 15 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 460 об/хв та сорочкою, потужність 1,1кВт; габаритні розміри: 1100*1000*1560 [9]
33-10	Збірник-змішувач для приготування 6% розчину хлоридної кислоти	1	Збірник-змішувач SR-15 «Naagen & Rinau Німеччина» об'ємом 15 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 460 об/хв та сорочкою, потужність 1,1кВт; габаритні розміри: 1100*1000*1560 [9]
33-12	Збірник-змішувач для приготування композиції Б (для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749)	1	Збірник-змішувач BSF-5L «BEIFAN Китай» об'ємом 5 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 460 об/хв та сорочкою, потужність 0,12кВт; габаритні розміри: 450*480*1500 [10]
РЗ-21	Реактор-змішувач для приготування композиції А (для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749)	1	Реактор-змішувач РС-40 «Хіммікс Україна» об'ємом 40л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 375 об/хв та сорочкою, потужність 1 кВт; габаритні розміри: 781*570*1400 [11]
33-14	Збірник-змішувач для приготування композиції Б (для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749)	1	Збірник-змішувач BSF-50L «BEIFAN Китай» об'ємом 50 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 460 об/хв та сорочкою, потужність 0,2кВт; габаритні розміри: 580*580*2100 [12]
РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування композиції А (для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749)	1	Реактор-змішувач «Bibby Америка» об'ємом 400л; Матеріал деталей, що контактує з продуктом – нержавіюча сталь AISI 316L, потужність реактора - 9.5 кВт, Частота обертання якірної мішалки – 93,3 об/хв, Потужність нагрівального елемента сорочки (ТЕН) - 8 кВт; Габаритні розміри - 750 мм діаметр, 950 мм пряма сторона [13]
33-19	Збірник-змішувач для приготування композиції Б (для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749)	1	Збірник-змішувач об'ємом 500 л Матеріал деталей, що контактує з продуктом – нержавіюча сталь AISI 316L, потужність реактора - 5.5 кВт, Частота обертання гомогенізатора – 0-3000 об/хв, Потужність нагрівального елемента сорочки (ТЕН) - 18 кВт; Габаритні розміри (ДД х Ш х В) - 1150 х 1350 х 2050 мм, виробник - STS Group (Україна)[14]

РЗ-29	Реактор-змішувач для приготування композиції А (для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442)	1	Реактор-змішувач SR-15 «Naagen & Rinau Німеччина» об'ємом 15 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 460 об/хв та сорочкою, потужність 1,1кВт; габаритні розміри: 1100*1000*1560 [9]
ЗЗ-31	Збірник-змішувач для приготування композиції Б (для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442)	1	Збірник-змішувач SR-15 «Naagen & Rinau Німеччина» об'ємом 15 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 1460 об/хв та сорочкою, потужність 1,1кВт; габаритні розміри: 1100*1000*1560 [9]
РЗ-33	Реактор-змішувач для приготування композиції А (для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442)	1	Реактор-змішувач «Bibby Америка» об'ємом 400л; Матеріал деталей, що контактує з продуктом – нержавіюча сталь AISI 316L, потужність реактора - 9.5 кВт, Частота обертання якірної мішалки – 93,3 об/хв, Потужність нагрівального елемента сорочки (ТЕН) - 8 кВт; Габаритні розміри - 750 мм діаметр, 950 мм пряма сторона [13]
ЗЗ-36	Збірник-змішувач для приготування композиції Б (для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442)	1	Збірник-змішувач BSF-150L «BEIFAN Китай» об'ємом 150 л. Виготовлений з нержавіючої сталі SUS316L/SUS304 оснащений мішалкою 600 об/хв та сорочкою, потужність 0,25кВт; габаритні розміри: 1200 x 1220 x 1875 мм [15]
УБС-41	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації з продуктивністю 5 м3/год Матеріал: нержавіюча сталь; температура стерилізації – 131 °С; містить 2 теплообмінника. Тиск пари: 0,5 МПа, тиск стиснутого повітря 0,4 МПа, Габаритні розміри: 3000x2500x3000 Виробник: Китай. Виготовлення на замовлення.
ІН-23	Інокулятор	1	Інокулятор Biostat® Сplus об'ємом 12 літрів «Sartorius Німеччина» Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L; оснащений датчиками температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини, необслуговуваним приводом мішалки 1500 об/хв, барботером, стерильними фільтрами і охолоджувачем вихідного відпрацьованого газу;максимально допустимий тиск: 2 бар; габаритні розміри: 1900 x 1020 x 750 мм [16]

Закінчення таблиці 6.1.

ІН-42	Інокулятор	1	Інокулятор Biostat® Cplus об'ємом 30 літрів «Sartorius Німеччина» Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L; оснащений датчиками температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини, необслуговуваним приводом мішалки 600 об/хв, барботером, стерильними фільтрами і охолоджувачем вихідного відпрацьованого газу;максимально допустимий тиск: 2 бар; габаритні розміри: 1900 x 1020 x 750 мм [16]
ІН-25	Інокулятор	1	Інокулятор «Zhang (Китай)» об'ємом 125 літрів Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L; оснащений датчиками температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини, мішалкою 350 об/хв, водяною сорочкою,барботером, стерильними фільтрами і охолоджувачем вихідного відпрацьованого газу; потужність: 1.1кВт;габаритні розміри: висота 800мм, діаметр 400мм [17]
ІН-27	Інокулятор	1	Інокулятор «АВЕС (Америка)» об'ємом 1250 літрів Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L; оснащений датчиками температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини, мішалкою 75 об/хв, водяною сорочкою,барботером; потужність: 5кВт; габаритні розміри: висота 1600мм, діаметр 1000мм [18]
ІН-44	Інокулятор	1	Інокулятор «Zhang (Китай)» об'ємом 630 літрів Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L; запобіжний клапан:1,5 бар,оснащений датчиками температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни і культуральної рідини, мішалкою 150 об/хв, водяною сорочкою,барботером; потужність: 2,5кВт;габаритні розміри: висота 1500мм, діаметр 800мм мм [19]
ФР-47	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 10 м ³ «Хіммаш Україна» оснащений турбінною мішалкою зі швидкістю обертання валу 164 об/х . Робочий тиск 0,3 МПа. Завантаження та вивантаження - насосом та стисненим повітрям. Габаритні розміри: D-1800 мм, Н-8700 мм. [20]
НВ-48	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий АВК400 «Лео Україна» 3кВт-потужність; тиск 6 бар; максимальний напір: 17 м; продуктивність:1100л/хв; матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304 [21]

Примітка*пошук обладнання здійснювали з використанням таких ресурсів:

1. Виробничо Комерційне Підприємство «ГАЗСІЛЬБУД ЛТД» [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kompresori.com.ua/ua/p4972040-vozduhosbornik-resiver-vertikalnyj.html>
2. ВЕНТ-ФІЛЬТР [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtry-vozdushnye-kassetnye-klass-filtratsii-f7/>
3. DALGAKIRAN Турбокомпресор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-tra-tm/>
4. Eccoair Осушувач [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://eccoair.ua/nasha-produkcia/osushuvachi-stisnenogo-povitrya-refrigeratornogo-tyra-dalgakiran-serii-dk-z-tochkoi-rosi/>
5. Prom Ресивер 500 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/ua/p85319536-resiver-500-bar.html>
6. Венкон Нагрівач повітря [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-500x250-2>
7. Zakupka.com Фільтр повітряний [Електронний ресурс] – режим доступу: https://zakupka.com/uk/p/1611553264-filtr-kassetnyy-vozdushnyy-klass-filtracii-f9/?srsrtid=AfmBOopfm9OSOxFNZB2hZi_2DU0AtMaJ7pGIpNhyL7ndjl1rHHZQ2Te
8. Коприг Магістральні фільтри [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.koprig.com.ua/koprig/vozduh/filter_SPF.html
9. Foeth stock Реактор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.foeth.com/ru/te-nologicheskie-sosudy/te-nologicheskie-emkosti/haagen-rinau-sr-15-tehnologicheskij-sosud-056y336/>
10. Beifan [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>
11. Реактор гомогенізатор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/reaktor-gomogenizator-40l>
12. Beifan Реактор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/50l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>
13. STS Group Реактор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://perryvidex.eu/product/400-ltr-3-bar-int-6-bar-jkt-kw-agit-L1591-05>

14. STS Group Реактор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1719401925-reaktor-laboratornyj-500.html>
15. Achive Реактор[Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.achievechem.com/chemical-equipment/stainless-steel-reactor.html>
16. САРТОКАРАТ [Електронний ресурс] – режим доступу: Виготовлено інокулятор об'ємом 12л. на замовлення компанією Sartorius <https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/sterilizuyemi-na-misczi-fermenteri-bioreaktori-cip/biostat-cplus/>
17. Zhang [Електронний ресурс] – режим доступу: Виготовлено на замовлення об'ємом 125 л. компанією Zhang https://www.zhanghua1976.com/Biological-fermentation-tank/vertical-pressure-vessel-biological-fermentation-tank?_gl=1*1wc5gms*_up*MQ..*_gs*MQ..&gclid=CjwKCAiAhP67BhAVEiwA2E_9gxVe7mpdl0oS160H6aPD9_nmhhN380cr3gjevUjRAQn9f1S8x-seqRoC9_kQAvD_BwE
18. Used 1,250 Liter ABEC Fermenter / Bioreactor [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.bioprocessonline.com/doc/used-liter-abec-fermenter-bioreactor-0001>
19. Zhang [Електронний ресурс] – режим доступу: Виготовлено інокулятор об'ємом 630л. на замовлення компанією Zhang https://www.zhanghua1976.com/Biological-fermentation-tank/vertical-pressure-vessel-biological-fermentation-tank?_gl=1*1wc5gms*_up*MQ..*_gs*MQ..&gclid=CjwKCAiAhP67BhAVEiwA2E_9gxVe7mpdl0oS160H6aPD9_nmhhN380cr3gjevUjRAQn9f1S8x-seqRoC9_kQAvD_BwE
20. Prozorro продажі Реактор [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prozorro.sale/auction/CSE001-UA-20240301-00414/?form=MG0AV3>
21. Sigma Ukraine Насос відцентровий [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobezchnyy-380v-3kvt-hmax-17m-qmax-1100l-min-nerzh-leo-3-0-7755373/?srsId=afmbooplwcwjthedf2i-osgtdy1gyqnahqjwenls-iwdvrqhmxbw1o>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ

Технологічний процес біосинтезу курдлану *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 і *Trichoderma harzianum* GIM 3442 складається із допоміжних та основних робіт. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, підготовка і стерилізація поживного середовища. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: приготування посівного матеріалу та промисловий біосинтез.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір аераційного повітря

Повітря забирають за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1), який розташований на висоті в діапазоні 20-30 м.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення

Повітря очищують від грубого аерозолю, пилу, захищають компресори від забруднення та знижують кількість контамінантів за допомогою фільтрів попереднього очищення (Ф-2).

ДР 1.3. Стиснення повітря.

Повітря стискається у турбокомпресорі (К-3) до 0,35–0,5 МПа для подолання опору фільтрувальних матеріалів та гідравлічного опору.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи.

Повітря охолоджується у водяному теплообмінному апараті (Т-4) та видаляється волога у краплевловлювачі. Для остаточного видалення конденсованої вологи та вирівнювання тиску повітря подають у ресивер (Р-5).

ДР 1.5. Нагрівання повітря.

В теплообміннику-нагрівачі (ТН-6) повітря нагрівають до 35°C, щоб запобігти конденсації на фільтрах.

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Старінський С.В.			Літ.	Арк.	Архів
Перевір.		Резніченко Ю. М.				66	100
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н.Контр							
Затверд.		Стабніков В. П.					

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі.

Головні фільтри (Ф-7) очищують повітря до ступеня чистоти 98%.

ДР 1.7. Очищення повітря у індивідуальному фільтрі.

Через колектори, повітря надходить від головних фільтрів до індивідуальних фільтрів (Ф-24) (Ф-26) (Ф-28) (Ф-43) (Ф-45) (Ф-46) на кожному ферментері, де затримується 99,999% мікроорганізмів. Як індивідуальні фільтри використовуються волокнисті та пористі матеріал, які забезпечують максимальну чистоту повітря. Фільтри стерилізуються нагріванням вологою парою при 125–130°C і висушуються гарячим повітрям.

ДР 2. Підготовка титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl

Для приготування 12 908,02 мл 6%-го розчину HCl у збірник-змішувач (ЗЗ-10) об'ємом 15 л подають за допомогою лічильник (ЛІ-11) 10841,8 мл питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 500 мл при постійному перемішуванні 2093,2 мл 37%-ого розчину HCl.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 12 л.

Для приготування 13,92 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 0,84 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 10 мл додають 13,08 мл питної води, перемішують. Стерилізують в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 30 л.

Для приготування 36,1 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 2,2 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 100 мл і за допомогою мірного циліндра на 50 мл додають 33,9 мл питної води,

перемішують до розчинення. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 125 л.

Для приготування 126,0 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 7,56 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу 500 мл і за допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 118,44 мл питної води, перемішують до розчинення. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.4. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 630 л.

Для приготування 626,0 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 37,56 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 1 л і за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 588,44 мл питної води, перемішують до розчинення. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.5. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 1250 л.

Для приготування 1206,0 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 72,36 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 2,5 л і за допомогою мірного циліндра на 1000 мл додають 1133,64 мл питної води, перемішують до розчинення. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.5. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 10 м³.

Для приготування 10,9 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 654 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-8) 15 л і за допомогою автоматизованого лічильник (Л-9)

додають 10,25 л питної води, перемішують до розчинення. Стерилізують в реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Agrobacterium sp. ATCC 31749 в колбах на качалках.

ДР 3.1.1. Приготування композиції А для культивування

На технічних вагах зважують 15,4 г глюкози, 0,77 г дріжджового екстракту та переносять у колбу об'ємом 1 л. Використовуючи мірний циліндр об'ємом 500 мл додають питну воду (400 мл) та перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,34 г K_2HPO_4 та переносять у колбу об'ємом 200 мл. Мірним циліндром об'ємом 250 мл додають 100 мл питної води та перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,4 г MgSO_4 та переносять у колбу об'ємом 500 мл. Мірним циліндром об'ємом 500 мл додають 270 мл питної води та перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Agrobacterium sp. ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 12 л

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 138,6 г глюкози, 69,3 г дріжджового екстракту і переносять у бутль об'ємом 2,5 л. Додають мірним циліндром 2,0 л води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 12,06 г K_2HPO_4 , 3,5 г MgSO_4 . Наважки поміщають у збірник-змішувач (ЗЗ-12) об'ємом 5,0 л, додають за допомогою лічильник (Л-13) 4,48 л питної води, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,0-4,5, перемішують. Перекачують розчин в інокулятор (І-23) 12 л і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Agrobacterium sp. ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 125 л

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1260,0 г глюкози, 630,0 г дріжджового екстракту. Суміш переносять в реактор-змішувач (РЗ-21) на 25 л, через лічильник (Л-22) додають 16,5 л води питної і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 109,62 г K_2HPO_4 , 31,5 г MgSO_4 . Наважки поміщають у збірник-змішувач (ЗЗ-14) об'ємом 50,0 л додають за допомогою лічильника (Л-15) 39,0 л питної води, перемішують, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Перекачують розчин в інокулятор (ІН-25) на 125 л і в ньому стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту Agrobacterium sp. ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 1,25 м³

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Використовуючи об'ємно-ваговий дозатор (ОВД-17) у реактор-змішувач (РЗ-16) об'ємом 250 л подають 12,06 кг глюкози та 6,030 кг дріжджового екстракту. Через лічильник (Л-18) додають 165,4 л води питної і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1049,2 г K_2HPO_4 , 301,5 г MgSO_4 . Наважки поміщають у збірник-змішувач (ЗЗ-19) об'ємом 500,0 л додають за допомогою лічильника (Л-20) 365,2 л питної води, перемішують, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Перекачують розчин в інокулятор (ІН-27) на 1250 л і в ньому стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 3.5 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *Trichoderma harzianum* GIM 3442 в колбах на качалках.*

ДР 3.5.1. Приготування композиції А для культивування

На технічних вагах зважують 19 г глюкози, 14,25 г дріжджового екстракту та переносять у колбу об'ємом 1 л. Використовуючи мірний циліндр об'ємом 500 мл додають питну воду (500 мл) та перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 5,7 г K_2HPO_4 та переносять у колбу об'ємом 500 мл. Мірним циліндром об'ємом 250 мл додають 250 мл питної води та перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.5.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,38 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, та 0,76 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та переносять у колбу об'ємом 500 мл. За допомогою мірного циліндра об'ємом 250 мл додають 200 мл питної води та перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 3.6. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 30 л для *Trichoderma harzianum* GIM 3442*

ДР 3.6.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 361,0 г глюкози, 270,75 г дріжджового екстракту і переносять у реактор-змішувач (РЗ-29) об'ємом 15 л. Додають через лічильник (Л-30) 8,5 л води питної, перемішують і стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.6.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 148,5 г K_2HPO_4 , 61,9 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 19,8 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у збірник-змішувач (ЗЗ-31) об'ємом 15л додають за допомогою лічильника (Л-32) 7,1 л питної води, перемішують, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Перекачують розчин в інокулятор (ІН-42) на 30 л і в ньому стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.7. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 630 л для Trichoderma harzianum GIM 3442

ДР 3.7.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-34) зважують 6,26 кг пшеничних висівок, 6,26 кг пахімарану і подають у реактор-змішувач (РЗ-33) об'ємом 250 л. Додають через лічильник (Л-35) 170,5 л води питної, перемішують. Стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 20-30 хв.

ДР 3.7.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОВД-37) зважують 1565,0 г K_2HPO_4 , 156,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у збірник-змішувач (ЗЗ-36) об'ємом 150,0 л, додають за допомогою лічильника (Л-38) 101,2 л питної води, перемішують, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,0-4,5. Перекачують розчин в інокулятор (ІН-44) на 630 л і в ньому стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.8. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 м³

Об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 10 м³ складає 5,45 м³, тому стерилізація буде в УБС.

ДР 3.8.1. Приготування композиції А і стерилізація в УБС

Через ваговий дозатор (ОВД-40) у збірник об'ємом 10 м³ вносять 436,00 кг глюкози, 5,45 кг дріжджового екстракту, 16,4 кг КН₂РО₄, 10,9 кг (NH₄)₂SO₄, 8,18 кг MgSO₄ 7H₂O. Через лічильник (Л-39) подають 4521,0 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Отриманий розчин із реактора збірника насосом в УБС-5 (УБС-41), де відбувається стерилізація гострою парою за температури 131°C упродовж 5-7 хвилин.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу Agrobacterium sp. ATCC 31749

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (LB агар [8]) за температури 2-4 °C з пересівом 1-2 рази на місяць на свіже поживне середовище. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *Agrobacterium sp.* ATCC розсівають на чашки Петрі із LB агаром для одержання ізолюваних колоній. Вирощують у термостаті при температурі 30 °C (24 год).

ТП 4.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 із чашок Петрі (від ТП 4.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним LB-агаром (одну ізолювану колонію використовують для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізолювані колонії, які знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 24 години, температура 30 C. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У стерильну колбу об'ємом 1 л дотримуючись правил асептики вносять стерильну композицію А (від ДР 3.1.1), стерильну композицію Б (від ДР 3.1.2), стерильну композицію В (від ДР 3.1.3). перемішують і розливають по 145 мл у 5 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку із робочою культурою *Agrobacterium sp.* АТСС 31749 (від ТП 3.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (180 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 72 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 12 л

У посівний апарат із композицією Б (від ДР 3.2.2) додають композицію А (від ДР 3.2.1), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.4). Проводять культивування при температурі 30° С протягом 72 год. Швидкість обертів мішалки встановлюють на рівні 200 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 125 л

У посівний апарат із композицією Б (від ДР 3.3.2), додають композицію А (від ДР 3.3.1), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.3) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через трубу перетискуванням подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 4.5). Культивують, температура становить 30 °С упродовж 72 год. Швидкість обертів мішалки встановлюють на рівні 200 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.7. Вирощування в інокуляторі об'ємом 1250 л

У посівний апарат із композицією Б (від ДР 3.4.2), додають композицію А (від ДР 3.4.1), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.5) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 4.6). Культивують при температурі 30 °С упродовж 72 год. Швидкість обертів мішалки встановлюють на рівні 200 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу *Trichoderma harzianum* GIM 3442

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Trichoderma harzianum* GIM 3442 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (PDA [8]) при 2-4 °С з пересівом 1 раз на 2 місяці на свіже поживне середовище. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *Trichoderma harzianum* GIM 3442 розсівають на чашки Петрі із PDA для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 30 °С (24 год).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *Trichoderma harzianum* GIM 3442 із чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним PDA (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше

1 см. Тривалість вирощування становить 24 години, температура 30 С. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У стерильну колбу об'ємом 1 л дотримуючись правил асептики вносять стерильну композицію А (від ДР 3.5.1), стерильну композицію Б (від ДР 3.5.2), стерильну композицію В (від ДР 3.5.3), змішують і розливають по 145 мл у 6 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку із робочою культурою *Trichoderma harzianum* GIM 3442 (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (180 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 72 год і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 30 л

У посівний апарат із композицією Б (від ДР 3.6.2) додають композицію А (від ДР 3.6.1), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 7.4). Культивують при температурі 30° С упродовж 72 год. Швидкість обертів мішалки встановлюють на рівні 200 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 630 л

У посівний апарат із композицією Б (від ДР 3.7.2), додають композицію А (від ДР 3.7.1), вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-им

розчином NaOH (від ДР 2.2.4) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 5.5). Культивують при 30 °С протягом 72 год. Швидкість обертів мішалки встановлюють на рівні 200 об/хв.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У виробничий ферментер (ФР-47) об'ємом 10 м³, подають композицію А (від ДР 3.8.1). Вмикають перемішувальний пристрій. Через трубу перетискування подають з інокулятора посівний матеріал (від ТП 4.7). Культивують при температурі 30 °С упродовж 144 год. Після того як повністю вичерпається в поживному середовищі (NH₄)₂SO₄ через трубу перетискування у виробничий ферментер подається інокулят від ТП 5.6 Швидкість обертів мішалки встановлюють на рівні 200 об/хв.

Загальний час культивування складає 144 год.

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю. Культивування зупиняють після досягнення у культуральній рідині концентрації курдлану 47,9 г/л.

РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КУРДЛАНУ

Згідно із результатами представленими у роботі [8], курдлан у кількості 47,9 г/л виділяють із культуральної рідини *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 та *Trichoderma harzianum* GIM 3442. Однак під час виділення є певні труднощі із виділенням екзополісахариду, пов'язані із підвищеною в'язкістю середовища культуральної рідини. В'язкість курдлану стає меншою якщо додати лугу.

Тому, щоб виділити курдлан потрібно розбавляти розчин культуральної рідини лугом, а після видалення клітин нам необхідно концентрувати його до вихідного об'єму. Курдлан у природі існує у вигляді гранул, які нерозчинні у воді і етанолі, але розчинні у розчинах лугів NaOH, за рахунок іонізації водневих зв'язків [30,32,33], то обробка NaOH дозволяє знизити в'язкість і виділити екзополісахарид.

Курдлан виділяють із культуральної рідини методом екстракції передбачаються такі етапи: розчинення лугом, сепарування та осадження додаванням кислоти. Очищують курдлан методом мембранної фільтрації [32].

Виділення біомаси. Для розділення біомаси та культуральної рідини можна використати такі методи як: фільтрація, осадження за допомогою флокулянтів, осадження зміною розчинності речовини, дистиляція, кристалізація, сепарування та центрифугування, застосування вакуум-фільтрів; ультрафільтрація на мембранних фільтрах. Ультрафільтрація і застосування вакуум-фільтрів має потребу у попередній обробці культуральної рідини, тому що середовище в'язке і це призводить до забивання пор у фільтрах [31,33,34]. Флотація, осадження, кристалізація, сорбція, екстракція – не підходять, тому що потребують попередньої

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Старінський С.В.			Літ.	Арк.	Аркусів
Перевір.		Резніченко Ю. М.				78	100
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н.Контр							
Затверд.		Стабніков В. П.					
					РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КУРДЛАНУ		

обробки та підготовки, це є дорого для виробництва [34]. Тому на першому етапі культуральну рідину піддають сепаруванню при 18 000 об/хв протягом 30 хв після чого отриманий супернатант зливають.

Обробка супернатанту. Попередня обробка складається із підвищення в'язкості та осадження неорганічними розчинниками. У культуральну рідину додають 3 М розчин HCl до значення рН 6,0-7,0 і отриману суміш піддають сепаруванню повторно при 18 000 об/хв протягом 30 хв

Очищення. Для отримання чистого курдлану, використовують метод ультрафільтрації разом промиваючи водою. Суміш подають на установку ультрафільтрації (діаметр пор 0,001-0,1 мкм) і відбувається процес фільтрування, температуру розчину підтримують нижче 30 °С. Під час процесу в концентрований розчин подають чисту воду до моменту, поки не знизиться питома провідність розчину до 500-1800 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Процес фільтрації і промивання водою повторюють тричі. Після закінчення - фільтрують через Нутч-фільтр. Мембрана фільтру складається із полікапролактону або перхлорвінілу із діаметром пор 8-15 мкм [35, 36].

Ультрафільтрація має декілька переваг, а саме не робить теплових і хімічних впливів на продукт, проходить в герметичних умовах, що дуже добре для підтримки належного рівня асептики, в обслуговуванні є простою і не потребує значних енергетичних витрат [33-34].

Сушка. Курдлан використовують у промисловості у вигляді порошку, тому потрібно повністю видалити рідину для отримання готового продукту. Для цього використаємо технологію вакуумної сушки, вона відбувається за низьких температур і не впливає на структуру органічних речовин. Вологий курдлан передають на вакуумну сушку за температури 45-50 °С і сушать протягом 2-5 годин.

Висушену масу подрібнюють і просіюють. Чистота отриманого курдлану перевищує 95% [32].

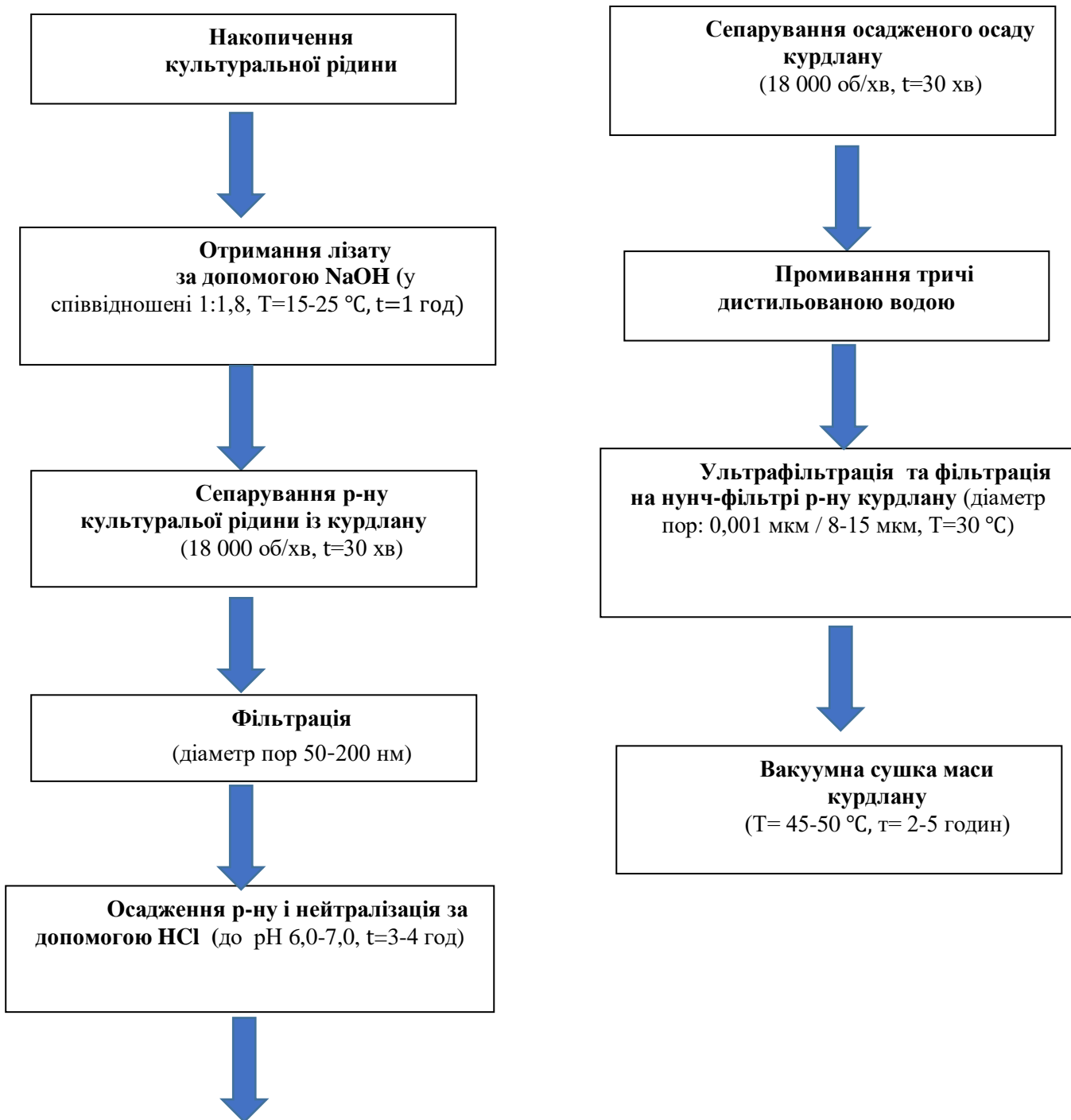


Рис 8.1. Технологічна схема отримання курдлану

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом процесу культивування кожні 4 год відбирають проби поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини для мікробіологічного контролю, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації курдлану та біомаси бактерій, контролю рівня джерела азоту (дріжджового екстракту) та джерела вуглецю (глюкози) у середовищі.

9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль необхідно здійснювати протягом виробничого процесу, аби бути впевненими, що підтримуються асептичні умови культивування для *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 та *Trichoderma harzianum* GIM 3442.

Щоб бути впевненими в стерильності поживних середовищ при вирощуванні інокуляту і після стерилізації середовищ для біосинтезу цільового продукту виконують мікробіологічний контроль, а також для своєчасного виявлення чужорідної мікрофлори у культуральній рідині і посівному матеріалі під час біосинтезу. Контроль здійснюється відбором проби простерилізованого поживного середовища із наступним висівом на чашки Петрі із агаризованим середовищем Чапека для ідентифікації грибів та дріжджів та на м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій.

Підготовка чашок Петрі. В стерильні чашки Петрі розливають рідкий агар (розплавлений на киплячій водяній бані). Потім чашки залишають для застигання поживного середовища і залишають протягом 2 – 3 діб у термостаті при 30 °C перевернутими чашками кришками донизу.

Посів здійснюють стерильною піпеткою, відбираючи 0,1 мл від об'єму проби, після чого вносять суспензію клітин на поверхню агаризованого середовища. Суспензію рівномірно розмазують на поверхні середовища

					НУХТ БТЕК 04.01.27 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Старінський С.В.			РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Архів
Перевір.		Резніченко Ю. М.					81	100
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр								
Затверд.		Стабніков В. П.						

стерильною бактеріологічною петлею, або стерильним шпателем Дригальського. Після цього чашки інкубують у термостаті при 28 – 30 °С протягом 1 – 2 діб (МПА) та 24 – 26 °С протягом 3 – 5 діб (СА або ГКА) [32].

Коли закінчився термін інкубації, чашки оглядають на наявність чужорідної мікрофлори. На чашках із посівами інокуляту культуральної рідини мають бути лише колонії *Agrobacterium sp.* та *Trichoderma harzianum* і не повинно бути сторонньої мікробіоти (рис. 9.1 та 9.2).

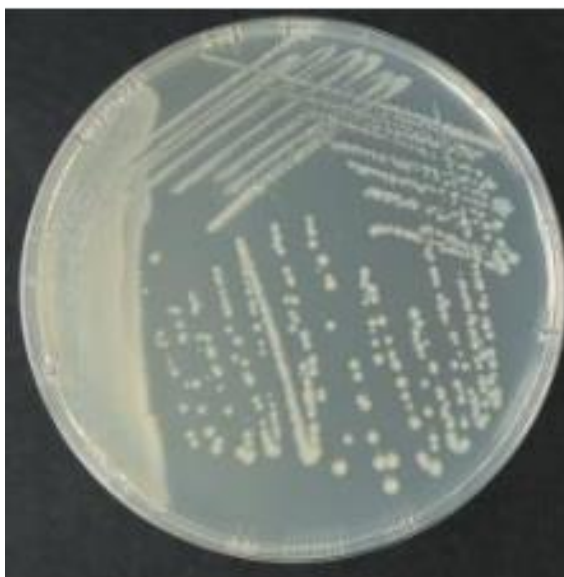


Рис. 9.1. Колонії Agrobacterium sp. на чашці із агаром [38]



Рис. 9.2. Колонії Trichoderma harzianum на чашці із картопляно-декстрозним агаром [39]

У світловому мікроскопі мікроскопіюють клітини *Agrobacterium sp.* та *Trichoderma harzianum*. Для приготування препарату в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять 10 мкл культуральної рідини на предметне скло. Краплю, яка містить клітини мікроорганізму, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (мазком близько 1 см). Мазок сушать при кімнатній температурі до повного випаровування вологи.

У випадку відсутності контамінації під час мікроскопіювання, ідентифікують клітини *Agrobacterium sp.* та *Trichoderma harzianum*. (рис 9.3 та 9.4).



Рис. 9.3. Зображення клітин *Agrobacterium sp.* у світловому мікроскопі



Рис. 9.4. Зображення клітин *Trichoderma harzianum* у світловому мікроскопі [39]

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Визначення концентрації біомаси бактерій та курдлану

Концентрацію курдлану визначали шляхом вимірювання сухої маси. Відповідним чином розведений зразок центрифугували при $5000 \times g$ протягом 30 хв. Осад, що складається з курдлану, промивали 0,01 М НСІ і збирали центрифугуванням. Потім додавали NaOH, 0,5 М, щоб розчинити курдлан протягом 1 години. Клітини розділяли центрифугуванням при $5000 \times g$ протягом 30 хв. Курдлан, присутній у надосадовій рідині, був осаджений шляхом додавання відповідного об'єму 2 М НСІ. І курдлан промивали і висушували до постійної ваги. Концентрацію біомаси *Agrobacterium sp* визначали флуоресцентною мікроскопією розбавили культуральну рідину з буферним розчином 1:10 мікроскопіювали при спектральному діапазоні 330-385nm . Для спільних культур використовували ваговий метод. [40].

9.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецю (глюкози) у середовищі

Джерело вуглецю у середовищі культивування – глюкоза. Необхідно відібрати проби культуральної рідини, центрифугувати при 13000 об/хв, протягом 5 хвилин з подальшою фільтрацією через фільтри 0,22 лм перед аналізом. Аналіз на глюкозу провести за допомогою біосенсора SBA-40D (Shandong Academy of Agriculture, Jinan, China) [41].

9.2.3. Визначення концентрації джерела Нітрогену (дріжджовий екстракт, сульфат амонію) у середовищі

Відібрану пробу культуральної рідини необхідно відцентрифугувати при 5000 об / хв (45 хв). Одержаний супернатант використовується для визначення вмісту азоту. Дріжджовий екстракт є джерелом амінного азоту. Складовими таких полімерних сполук є амінокислоти, тому пропонується використання методу Серенсена для визначення концентрації азоту. Метод Серенсена ґрунтується на взаємодії формальдегіду з вільними аміногрупами в амінокислотах. Під час реакції формальдегід, зв'язуючись з аміногрупою, тим самим утворює метиленову похідну амінокислоти. Таким чином втрачається основна властивість цих

аміногруп. Залишаються вільні карбоксильні групи, які титруються розчином лугу (0,1 М NaOH). NaOH вступає у реакцію з карбоксильними групами, при цьому утворюються кислотні солі, і змінюється колір індикатора, це є ознака для зупинки процесу титрування [42].

Проведення випробування. 20 мл супернатанту, вносять у конічну колбу, додають 5 мл формальдегіду. До суміші додають декілька крапель індикатора фенолфталеїну та здійснюють титрування, додаючи 0,3 мл 0,1 М NaOH. Після появи постійного блідо-рожевого кольору, який не зникає при перемішуванні, титрування зупиняють і результати виражають у г/л [43].

Джерелом Нітрогену при виробничому культивуванні є $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, визначення концентрації якого проводять при використанні метода Неслера. Іони амонію взаємодіють із реактивом Неслера з утворенням забарвленої сполуки жовто-коричневого кольору. 10 мл супернатанту (отриманого після відділення біомаси), переносять у мірну колбу на 100 мл, доводять до мітки дистильованою водою; далі з утвореного розчину відбирають аліквоту (5-10 мл) у мірну колбу на 100 мл, додають близько 80 мл дистильованої води, 1,0 мл реактиву Неслера і доводять об'єм розчину до мітки. Через 10 хв визначають екстинцію спектрофотометрично за довжини хвилі 430 нм з подальшим перерахунком за калібрувальним графіком [44].

Карта контрольних точок виробництва курдлану

Таблиця 9.1

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Повітрязабірник Висота забору повітря	-	Під час забору повітря	H=20-30 м
Кт 1.2 Очистка від грубих домішок	Повітря при виході з фільтра Ступінь очистки, перепад тисків	Ступінь очистки перевіряється відповідно до паспорту, манометр	Після проходження повітря через фільтр	E=90 %
Кт 1.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря Тиск, температура	Термометр, манометр	Після компресіювання повітря	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи	Охоложене повітря Температура, вологість	Термометр, психрометр	Після охолодження та видалення зайвої вологи	t = 25-40°C W=50-70°
Кт 1.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря Температура, вологість	Термометр, Психрометричний метод	Після нагрівання повітря	t= 60° C; W = <40%
Кт 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі	Очищене повітря Перепад тисків, ступінь очистки	Ступінь очистки перевіряється відповідно до паспорту, манометр	Після очистки повітря у головному фільтрі	E = 98 %;
Кт Км 1.7. Очищення повітря у індивідуальному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очистки, мікробіологічна чистота	Ступінь очистки перевіряється відповідно до паспорту, мікробіологічний контроль	Після очистки повітря у індивідуальному фільтрі	E = 99,99 %
Кх , 2.1 Приготування 6% розчину хлоридної кислоти	6% розчин HCl Концентрація	Хімічний метод	Концентрацію визначають після приготування розчину.	C=6%
Кт, Км 2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5.	6% розчин гідроксиду натрію	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрацію визначають після приготування розчину.	C=6%, t=131°C, τ-40 хв.

Приготування та стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду	Температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти			Відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749 в колбах на качалках Кт, Км 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 20-30 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749 в колбах на качалках Кт Км, 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 40 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749 в колбах на качалках Кт Км, 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 40 хв відсутність мікробіоти

<p>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 в колбах на качалках</p> <p>Кт, Км 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С, τ = 20-30 хв відсутність мікробіоти</p>
<p>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 в колбах на качалках</p> <p>Кт Км, 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв відсутність мікробіоти</p>
<p>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 в колбах на качалках</p> <p>Кт Км, 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В</p>	<p>Композиція В Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв відсутність мікробіоти</p>
<p>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування</p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний</p>	<p>t = 112 °С, τ = 20-30 хв відсутність мікробіоти</p>

інокуляту <i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 12 л Кт, Км, 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А			контроль після стерилізації	
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 12 л Кт, Км, 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 125 л Кт, Км, 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 20-30 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 125 л	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв відсутність мікробіоти

Кт, Км, 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б				
Приготування і стерилізація поживного середовища для виращування інокуляту <i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 1250 л Кт, Км, 3.5.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 20-30 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для виращування інокуляту <i>Agrobacterium</i> <i>sp.</i> ATCC 31749 в інокуляторі об'ємом 1250 л Кт, Км, 3.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа τ = 40 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для виращування інокуляту <i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> GIM 3442 в інокуляторі об'ємом 30 л Кт, Км, 3.6.1	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 20-30 хв відсутність мікробіоти

Приготування і стерилізація композиції А				
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 в інокуляторі об'ємом 30 л Кт, Км, 3.6.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P=0,15МПа τ=40 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 в інокуляторі об'ємом 630 л Кт, Км, 3.7.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ=20-30 хв відсутність мікробіоти
Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 в інокуляторі об'ємом 630 л Кт, Км, 3.7.2	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P=0,15МПа τ=40 хв відсутність мікробіоти

Приготування і стерилізація композиції Б				
Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 м ³ Кт, Км, 3.8.1 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа τ = 5-7 хв відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Пересів культури один раз на 2 місяці. Мікробіологічний контроль проводять кожні 1-2 місяці	t = 2-4 °С, τ = 2 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури	Колекційна культура <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години	t = 30 ± 1 °С, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах	Колекційна культура <i>Agrobacterium sp.</i> ATCC 31749 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години	t = 30 ± 1 °С, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування,	t = 30 ± 1 °С, τ = 72 год, W = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

			мікроскопіювання – кожні 4 години	
Кт, Км Кх 4.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 12 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ=72 год, рН=7 W=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Кх 4.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 125 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ=72 год, рН=7 W=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Кх 4.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1250 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ=72 год, рН=7 W=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Пересів культури один раз на 2 місяці. Мікробіологічний контроль проводять кожні 1-2 місяці	t = 2-4°С, τ=2 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури	Колекційна культура <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години	t = 30±1°С, τ=72 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 5.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах	Колекційна культура <i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3442 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ = 72 год, W = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Кх 5.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ = 72 год, рН = 7 W = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Кх 5.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 630 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ = 72 год, рН = 7 W = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.1. Виробний біосинтез у ферментері об'ємом 10 м ³	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, концентрація курдлану	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування; мікроскопіювання – кожні 4 години	t = 30±1 °С, τ = 144 год, рН = 7, W = 200 об/хв, C _{курдлану} = 47,9 г/л відсутність сторонньої мікробіоти

ЛІТЕРАТУРА

1. Zhang, R., & Edgar, K. J. Properties, Chemistry, and Applications of the Bioactive Polysaccharide Curdlan. *Biomacromolecules*, 2014, 15(4), 1079–1096. doi:10.1021/bm500038g
2. Yuan, M., Fu, G., Sun, Y., & Zhang, D. (2021). Biosynthesis and applications of curdlan. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118597. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118597
3. Мармаш, І. С. (2020). Біосинтез курдлану *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*.
4. Chen, Y., & Wang, F. (2020). Review on the preparation, biological activities and applications of curdlan and its derivatives. *European Polymer Journal*, 141, 110096. doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.110096
5. Imran M., Anwar Z., Irshad M., Asad M. J., Ashfaq H. Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review. *Advances in Enzyme Research*. 2016, 4: 44-55. doi: 10.4236/aer.2016.42005.
6. Liang Y., Zhu L., Ding H., Gao M., Zheng Z., Wu J., Zhan X. Enhanced production of curdlan by coupled fermentation system of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and *Trichoderma harzianum* GIM 3.442. *Carbohydr Polym.* 2017, 157:1687-1694. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.055.
7. Rofeal M., Abdelmalek F., Pietrasik J., Steinbüchel A. Sustainable curdlan biosynthesis by *Rahnella variigena* ICRI91 via alkaline hydrolysis of *Musa sapientum* peels and its edible, active and modified hydrogel for Quercetin controlled release. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, 15 (225):416-429. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.080.
8. Martinez C. O., Ruiz S. P., Nogueira M. T., E. Bona, Portilho M., Matioli G. Effective Immobilization of *Agrobacterium* sp. IFO 13140 Cells in Loofa Sponge

- for Curdlan Biosynthesis. *Molecules*. 2015, 20 (5): 7957-7973. doi: 10.3390/molecules20057957.
9. McIntosh M. Genetic Engineering of *Agrobacterium* Increases Curdlan Production through Increased Expression of the *crdASC* Genes. *Microorganisms*. 2023, 12 (1): 55. doi: 10.3390/microorganisms12010055.
10. Manasse, R. J., Staples, R. C., Granados, R. R., & Barnes, E. G. (1972). Morphological, biological, and physical properties of *Agrobacterium tumefaciens* bacteriophages. *Virology*, 47(2), 375-384.
11. Ruffing, A.M., Castro-Melchor, M., Hu, W.-S., and Chen, R.R. "Genome sequence of the curdlan-producing *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749." *J. Bacteriol.* (2011) 193:4294-4295.
12. Zhang W., Gao H., Huang Y., Wu S., Tian J., Niu Y., Jiang D. Glutamine synthetase gene *glnA* plays a vital role in curdlan biosynthesis of *Agrobacterium* sp. CGMCC 11546. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 165: 222–230. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.152.
13. Применение бета-глюкана в качестве иммуномодулирующей терапии у часто и длительно болеющих пациентов. Электронный ресурс. Режим доступа: <https://kleemed.com.ua/wp-content/uploads/glukany-3.pdf>
14. Li P., Zhang, X., Cheng Y., Li, J., Xiao Y., Zhang, Q., Wang, F. Preparation and in vitro immunomodulatory effect of curdlan sulfate // *Carbohydrate Polymers*.- 2014.- Vol.102, № 1.- P. 852–861 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861713011077?via%3Dihub>
15. Life Source Basics (WGP Beta Glucan), активатор імунної системи, 500 мг, 60 капсул. Электронный ресурс. Режим доступа: <https://ua.iherb.com/pr/life-source-basics-wgp-beta-glucan-immune-system-activator-500-mg-60-capsules/37887>

16. ДЕРЖАВНА СЛУЖБА СТАТИСТИКИ УКРАЇНИ. Електронний ресурс. Режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2023/zb/11/year_23_u.pdf
17. Liang Y., Zhu L., Ding H., Gao M., Zheng Z., Wu J., Zhan X. Enhanced production of curdlan by coupled fermentation system of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and *Trichoderma harzianum* GIM 3.442. *Carbohydr Polym.* 2017, 157:1687-1694. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.055.
18. Схема KEGG. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/map=ata00010&keyword=glucose>
19. Shin, H.-D., Liu, L., Kim, M.-K., Park, Y.-I., & Chen, R. (2016). Metabolic engineering of *Agrobacterium* sp. ATCC31749 for curdlan production from cellobiose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(9), 1323–1331. doi:10.1007/s10295-016-1805-z
20. Innova products. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.innovabiomed.com/bioreactor-fermenter-for-cultivated-meat.html>.
21. Пирог, Т. П. Становлення та розвиток біотехнології / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова // Загальна біотехнологія : підручник. - Київ : НУХТ, 2009. - С. 9-16.
22. «Стерил». [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://kaap.com.ua/ua/p1145742422-sterill-antiseptik_dlya.html?srsId=AfmBOophjIVXt-CgYTe9FBYntGRscBBwCdJFQtilXB9haxxzUYCILKnB
23. Handychem QV мило рідке. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://klineko.com.ua/vspomogatelnye-sredstva/handychem-qv/?srsId=AfmBOormozComyo5NzHQBIyNgB6wjIbFH47n_W7BgRQ4x6XY16wRf8xb
24. Сода каустична [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sata-group.com.ua/ua/p1615813768-kausticheskaya-soda-granulirovannaya.html#:~:text=%D0%94%D0%BB%D1%8F%20%D0%BE%D1%87%D0%B8%D1>

[%89%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%B6%D0%B8%D1%80%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%96%20%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%B0%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%85,%D0%BD%D0%B0%20%D0%BA%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BA%D0%B0%20%D1%85%D0%B2%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%BD%2C%20%D0%BF%D0%BE%D1%82%D1%96%D0%BC%20%D0%B7%D0%BC%D0%B8%D0%B9%D1%82%D0%B5.](#)

25. Інструкція на засіб САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/sanprof-universal-sanatsiia>
26. Миючий засіб LIV актив 132 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kwant.com.ua/na-golovnu/55-zasib-mijnij-luzhnij-pinnij-liv-aktiv-132-201.html>
27. НЕОПРИМ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/baltiachemi-neoprim>
28. DEZALDUM 20 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://atma.ua/profesijna-himiya/dezinfektsiya/zasib-dezinfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-51-da015000/?gclid=Cj0KCQjw5azABhD1ARIsAA0WFUHdI1knjismfbDTYluLESnmRgeCISIsD008i5BmDJkg0oKD_bXb3W08aAoZFEALw_wcB
29. Піногасник силіконовий: особливості та переваги [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://analitic.ub.ua/33597-pinogasnik-silikonoviy-osoblivosti-ta-perevagi.html> Aquinas N., Bhat R. M., Selvaraj S. A review presenting production, characterization, and applications of biopolymer curdlan in food and pharmaceutical sectors. *Polymer Bulletin*, 2022, Volume 79, pages 6905–6927, <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03860-1>.
30. Zhang, R., Edgar, K. J. Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan // *Biomacromolecules*. 2014. Vol.15, №4. - P.1079–1096
31. Mangolim C. S, Silva T. T, Fenelon V. C. Description of recovery method used for curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and its relation to the morphology and physicochemical and technological properties of the polysaccharide // *Plos one journal*. 2017. Vol. 12, № 2.- P. 408–418.
32. CN103897074A. Method for separating and purifying curdlan by use of membrane process [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/CN103897074A/en>

33. Common chemistry. CAS solution. Substance Details-[Електронний ресурс].Режим доступу:<http://www.commonchemistry.org/ChemicalDetail>
34. Методичні вказівки до виконання практичних робіт з курсу —Вступ до фаху|| для студентів спеціальності —Промислова біотехнологія|| усіх форм навчання / Укл.: О.В. Кузнецова, С.М. Лисицька. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2008. – 45 с
35. Нутч-фільтр. Принцип роботи. [Електронний ресурс].-Режим доступу: <http://nutch-filters.ho.ua/>
36. Ультрафільтраційна установка. - [Електронний ресурс].- Режим доступу:<https://ua.all.biz/uk/ultrafiltracijna-ustanovka-nagema-5000-lchg1662915>
37. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
38. Agrobacterium sp. Електронний ресурс. <https://www.gmbank.org/search?q=agrobacterium>
39. Silva P. H. V., Vaz Souza A. G., de Araujo L. D., Frezarin E. T., de Souza G. V. L., de Souza G. V. L., da Silveira C. M., Rigobelo E. C. Trichoderma harzianum and Bacillus subtilis in Association with Rock Powder for the Initial Development of Maize Plants. Agronomy, 2023, 13(3), 872. doi: 10.3390/agronomy13030872
40. Lee J. H., Lee I. Y. Optimization of uracil addition for curdlan (-1,3-glucan) production by Agrobacterium sp. Biotechnology Letters, 2001, 23(14), 1131–1134.
41. Zhang H., Zhang J., Bao J. High titer gluconic acid fermentation by Aspergillus niger from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. Biore-source Technology, 2016, 203:211-219. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.042

42. Шаповалов Є. Визначення Нітрогену амінних груп методом формольного титрування [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://stemua.science/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D0%B8/2807-2/>.
43. Prabakaran G., Hoti S. L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008, 35 (9): 961–965. doi: 10.1007/s10295-008-0370-5.
44. Метод Неслера [Електронний ресурс]//Режим доступу: <http://uapatents.com/5-57802-sposib-viznachennya-amonijnogo-azotu.html>

volume for 48–96 h. 30 g of sterile CaCO₃ per 100 g of glucose was added to fermentation medium for pH control in flasks, and 5 M NaOH was used for pH control in fermentors. Medium and water used above were autoclaved at 115 °C for 20 min. 30 g CaCO₃ powder (equivalent to 0.28 mol considering the impurities in it) was added to flasks before the fermentation started by taking advantage of low solubility in water and the slow release to neutralize the 0.56 mol gluconic acid produced by 100 g glucose and maintain the pH at 6.0.

2.6. Analysis of sugars, gluconic acid and inhibitors

Samples were taken periodically and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min followed by filtration through 0.22 μm filters before analysis. Glucose was analyzed using SBA-40D biosensor (Shandong Academy of Agriculture, Jinan, China). Gluconic acid was analyzed using HPLC (LC-20AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a Shodex Rspak JJ50-4D column (Showa Denko, Tokyo, Japan) at 40 °C using the mobile phase of 12 mM NaHCO₃ at the rate of 0.5 mL/min.

Acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural, furfural alcohol, HMF and HMF alcohol were analyzed using HPLC (LC-20 AD, refractive index detector RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) with an Aminex HPX-87H column (Bio-rad, Hercules, CA, USA) at 65 °C using the mobile phase of 5 mM H₂SO₄ at the rate of 0.6 mL/min.

Phenolic compounds including vanillin, vanillic acid, syringaldehyde, syringate, 4-hydroxybenzaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid and coniferaldehyde were analyzed using HPLC (LC-20AT, UV/VIS detector SPD-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a YMC-Pack ODS-A column (YMC, Tokyo, Japan) at 35 °C and 270 nm at the flow rate of 1.0 mL/min. The detailed procedure was that the initial mobile phase was composed of 0.1% formic acid (pump A) and acetonitrile (pump B) at a ratio of 90–10%. Acetonitrile was increased from 0% to 10% from 1 to 15 min, then acetonitrile was increased from 10% to 35% over 15 to 20 min, finally, acetonitrile was used at 10% over 20 to 30 min (Khoddami et al., 2013).

2.7. Glucose oxidase activity assay

Glucose oxidase activity was measured according to the method by Barham and Trinder (1972). Briefly, hydrogen peroxide produced in glucose oxidation was determined by coupling phenol and 4-aminoantipyrine to generate red quinone imine compound at 37 °C, pH 7.0 in a reaction solution containing 2 mL of 50 mM β-D-glucose, 1 mL of 25 mM 4-aminoantipyrine, 1 mL of 25 mM

$$\text{Gluconic acid yield (\%)} = \frac{[GA] \times V - [GA]_0 \times V_0}{[Glu]_0 \times V_0 \times 1.089} \times 100\%$$

where [GA] and [GA]₀ indicate the concentrations of gluconic acid at the end and the start of gluconic acid fermentation, respectively (g/L); [Glu]₀ indicate glucose concentration at the start of fermentation (g/L); 1.089 is the conversion factor for glucose to equivalent gluconic acid derived from the molecular weight ratio; V and V₀ indicate the volumes of fermentation broth at the end and the start of the gluconic acid fermentation, respectively (L).

2.9. Setting time and fluidity assay

Gluconic acid fermentation broth was purified by centrifugation, filtration, and decoloration to obtain the final sodium gluconate solution at 384 g/L. The setting time of the cement paste was determined on a Vicat apparatus according to Chinese Standard Protocol GB/T 1346-2011. The fluidity of the cement mortar was determined according to the Chinese Standard Protocol GB/T 2419-2005 using a cement mortar rheometer. Cement was loaded into the conical mortar and vibrating for 25 s at the frequency of 1 s⁻¹ inside the rheometer. The circle diameter of the cement mortar flow was measured to give the average value as the fluidity of cement mortar (mm).

3. Results and discussion

3.1. Gluconic acid fermentation of *A. niger* SIIM M276 in corn stover hydrolysate

Gluconic acid fermentation of *A. niger* SIIM M276 was carried out in synthetic medium and corn stover hydrolysate as feedstocks (Fig. 1). The most significant difference was its long lag phase in corn stover hydrolysate: 48 h for cell growth starting, 96 h for gluconic acid formation, and 144 h for complete glucose utilization. As the comparison in synthetic medium, cells grew immediately after inoculation, glucose consumed completely and gluconic acid reached its maximum within 72 h. The inhibitor compounds in the initial corn stover hydrolysate were measured and high inhibitor concentrations were discovered at 3.24 g/L of acetic acid, 0.20 g/L of 5-HMF, 0.37 g/L of furfural, 0.16 g/L formic acid, 0.21 g/L levulinic acid, 0.11 g/L vanillin, 0.06 g/L syringaldehyde, 0.02 g/L 4-hydroxybenzaldehyde, 0.01 g/L coniferaldehyde. The three major inhibitor compounds from dilute acid pretreatment including furfural, HMF and acetic acid were monitored during the 144 h fermentation period in corn stover hydrolysate and

Spore count

Culture samples were heat treated at 80 °C for 15 min, serially diluted and plated on NYSM agar plates. Plates were incubated at 30 °C for 48 h and the developing *B. thuringiensis* var. *israelensis* colonies were counted and expressed in CFU ml⁻¹.

Toxicity test

The dried cell biomass produced by lyophilization was assayed against early fourth instars laboratory-reared *Aedes aegypti* larvae. Lyophilized powders of *B. thuringiensis* var. *israelensis* was prepared in sterile distilled water and added to disposable cups, each containing 50 larvae in 250 ml of chlorine free tap water. All tests were conducted at 28 ± 2 °C. Each experiment included six concentrations of four replicates each, along with the appropriate control. Larval mortality was scored after 24 h and corrected for control mortality, using Abbott's formula [1]. The experiment was done three times on different days. The results are expressed in ng ml⁻¹. Probit regression analysis [6] was carried out to calculate LC₅₀.

Amino nitrogen estimation

The amino nitrogen content of the fermentation broth was determined by the method of Sorenson's Formol Titration method [11] and is as follows: a aliquot of 20 ml of culture supernatant taken into a clean conical flask was added with 5 ml of HCHO and kept for 2 min. A few drops of phenolphthalein indicator were then added and titrate against NaOH. The end point was the appearance of the permanent pale pink color. The titration was repeated for concordant values and the results are expressed in mg ml⁻¹.

Statistical analysis

A one-way ANOVA test was used to compare the mean maximum spore count, biomass, mosquito larvicidal toxicity and amino nitrogen level among different media. Pairwise comparison of the media was done using the Post-hoc

Table 1 Toxicity of different hourly cultures of *B. thuringiensis* var. *israelensis* grown in Medium A, B and C against early fourth instar *Aedes aegypti* larvae

Hours	LC50 (ng ml ⁻¹) (95% FL)		
	Medium A	Medium B	Medium C
4	0	0	0
8	0	0	0
12	458.04 (414.58–506.06)	395.29 (357.10–437.57)	351.92 (318.05–389.39)
16	79.89 (72.72–87.77)	67.84 (61.84–74.42)	59.51 (53.97–65.61)
20	38.41 (34.92–42.26)	31.47 (28.50–34.66)	22.62 (20.51–24.95)

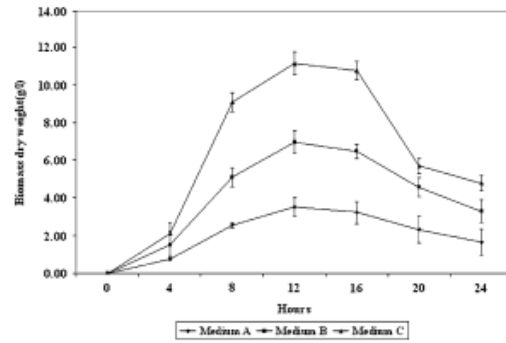


Fig. 1 Dry biomass of different hourly cultures of *B. thuringiensis* var. *israelensis* grown in medium A, B and C

multiple comparison test based on least significant difference (LSD).

Results

The biomass produced by different media containing different level of amino nitrogen varied significantly. The biomass (dry weight) obtained was 1.64 g l⁻¹ (SE ± 0.4), 3.29 g l⁻¹ (SE ± 0.34) and 4.78 g l⁻¹ (SE ± 0.23) when grown in medium A, B and C, respectively (Fig. 1). The mean maximum biomass differed significantly between the three media [(F = 21.98, df = (2,6), P = < 0.002]. The mean biomass yield from medium "C" was significantly higher than that from medium "B" and "A" (Post-hoc multiple comparison test, P < 0.0076).

A maximum spore count of 3.24 × 10¹¹ CFU ml⁻¹ was obtained in medium "C" followed by medium "B" 8.5 × 10¹⁰ CFU ml⁻¹ while medium "A" 3.7 × 10¹⁰ CFU ml⁻¹ (Fig. 1). The mean maximum spore counts differed significantly between media [F = 514.990, df = (2,6), P = < 0.0001]. Thus, the mean spore count from medium "C" was significantly higher than that from medium "B" and "A" (Post-hoc multiple comparison test, P < 0.0001).

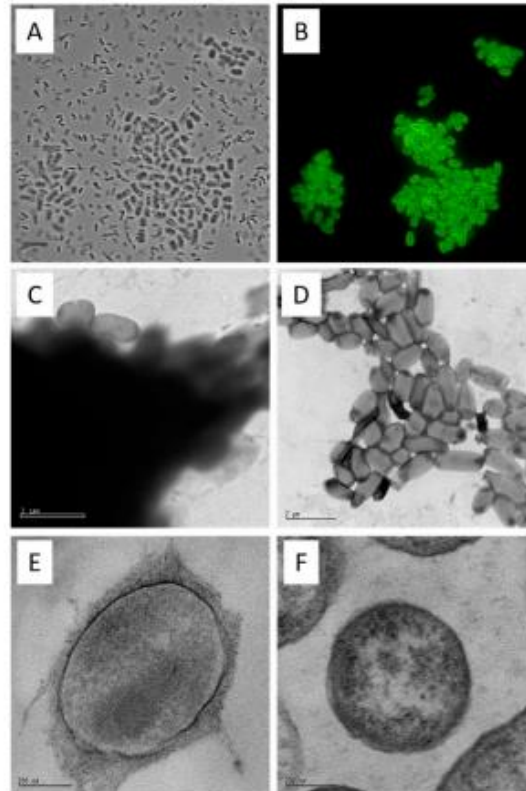


Figure 2. Curdlan forms a capsule. *Agrobacterium* sp. 31749 cells were grown for 7 days in *agrobacterium* defined broth (ADB) and subjected to microscopic analyses. Cells were stained with aniline blue fluorophore and photographed with bright field ((A), bar = 5 μ m) and fluorescence ((B), excitation at 330–385 nm, emission at 420–475 nm). (A,B) photographs are from the same field. (Note that this sample was prepared by firmly pressing the glass slide and the object cover together, resulting in the disruption of some cells from the cell aggregates). Cells grown in ADB from strain 31749 (C) and 31749 *crdS* disruptant (D) were stained with uranyl acetate and viewed using electron microscopy (bar = 2 μ m). These strains were also subjected to scanning electron microscopy ((E,F), bar represents 200 nm). The curdlan capsule appears as a dark cloud in (C), and an irregular outer layer in (E). The capsule is absent in a *crdS* mutant (D,F).

Media and culture conditions. *Agrobacterium* strains were routinely grown at 30 °C for a minimum of 3 d on aniline blue agar (ABA) [34]. For liquid cultures (shaken at 130 rpm), strains were grown in Luria broth (LB, 10% Oxoid bacto-tryptone, 5% Oxoid yeast extract, 10% NaCl) or *agrobacterium* defined broth (ADB). ADB is medium that is weakly buffered with a phosphate solution, so that initial growth of *agrobacterium* is around pH 7, which then subsequently drops to around pH 5.5 at the onset of curdlan production [34,50]. ADB consists of 4% (*w/v*) glucose (or 4% mannitol), 20 mM KNO₃, 2.8 mM K₂HPO₄, 12.8 mM KH₂SO₄, 11.5 mM Na₂SO₄, 1.25 mM MgCl₂, 0.09 mM FeCl₃, 0.05 mM MnCl₂, 1.0 mM citric acid, adjusted to pH 7.0 with NaOH before autoclaving. (Sterile glucose was added to the salts solution after autoclaving.)

MOPS-buffered medium was previously used for growth of *sinorhizobium meliloti* in a defined medium [58] and also supported curdian production by *agrobacterium*. The MOPS medium consists of 50 mM MOPS (adjusted to pH 7 with KOH), 55 mM mannitol, 5 mM Na glutamate (or 20 mM for excess N), 250 μ M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 37 μ M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 48 μ M H_3BO_3 , 10 μ M $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 μ M $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 μ M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mM K_2HPO_4 , and 4 μ M biotin.

Microscopy. Fluorescence microscopy: An Olympus BX50 microscope with a xenon lamp and on a Zeiss Universal light microscope with ultraviolet light (365 nm from an OSRAM HBO-100 lamp) were used. Images were captured with an RT Monochrome SPOT camera (Diagnostic Instruments Inc., Foxboro, MA, USA). Complexes of curdian with the (1 \rightarrow 3)- β -glucan specific, Aniline Blue Fluorochrome (ABF) (Biosupplies Australia Pty. Ltd., Bundoora, Australia) were detected by mixing one drop of a 7-day culture from ADB with one drop of a 0.01% ABF solution on a glass slide, covering with a coverslip, which was then firmly pressed onto the slide. Fluorescence from the ABF-curdian complex was observed with excitation at 330–385 nm and emission at 420+ nm. For vital staining: 10 mL of a 4d-ADB culture was incubated with 5 mM 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) [59] for 1 h on a shaker (130 rpm) at room temperature. A drop of the culture was prepared as described above for fluorescence of ABF-curdian complexes. Intracellular CTC fluorescence was observed with excitation at 530–550 nm and emission at 590+ nm using the same optics as described above.

Electron microscopy. Cells from ADB cultures were harvested and washed in water by centrifugation at forces not exceeding 500 g. Samples were mounted on formvar-coated, 300-mesh copper grids, and negatively stained with 2.5% uranyl acetate for observations using a Philips 420 transmission electron microscope (TEM) at 100 kV. Images were captured with a GATAN camera, with a 20 \times magnification factor. For cell-sections, colonies were harvested from ABA and fixed in a solution of 5% glutaraldehyde and 4% para-aldehyde in 0.2 M calcium cacodylate, 0.1 M K_2HPO_3 (pH 7.0), for one day, washed in 0.1 M cacodylate, and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate. The cells were dehydrated in a graded series of ethanol (50–100%) each for 15 min, followed by 100% acetone, infiltrated in a 25% solution of Spurr resin (Electron Microscopy Science) in acetone for 1 h, followed by 1 h incubations in 50% and 75% resin. Specimens were finally embedded in 100% resin overnight, and the resin polymerized at 60 $^\circ\text{C}$ for 30 h. Specimen blocks were sectioned at 0.5 μ m thickness, stained with lead citrate-uranyl acetate and viewed under a Philips 420 TEM at 100 kV.

Particle counting. ADB cultures grown for 2 to 7 d were diluted (1 in 10) with 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0) before analyzing with a particle counter/sizer (CDA-500, Model: F-520p, Sysmex) with a 100 μ m aperture detector. Particles were measured at two ranges: 10–40 μ m and 40–100 μ m.

96-well plate assay. Sterile, transparent, flat-bottom 96-well microplates (Greiner Bio-One) were prepared by adding 100 μ L of 1% agar (liquid, 60 $^\circ\text{C}$) containing aniline blue and nutrients from ADB or MOPS medium to each well. After the agar had cooled to room temperature, 20 μ L of ADB or MOPS medium inoculated with *agrobacterium* was pipetted onto the agar, and the plate was covered with a transparent plastic lid (with condensation rings, high profile, clear, sterile, Greiner Bio-One) and incubated in a Tecan reader (Infinite 200Pro (M Nano+)) at 30 $^\circ\text{C}$ up to 72 h. The Tecan reader was programmed to measure the cultures growing in the well automatically at 3 h intervals.

Curdian extraction. Curdian was harvested from liquid cultures of *agrobacterium* as follows: The liquid culture (1 L) was subjected to centrifugation at 4000 $\times g$, 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 L water. NaOH was added to the cell suspension a final concentration of 0.5 M, and stirred for 5 min. The cells were removed by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 10 min. The supernatant was removed to a clean container carefully without disturbing the cell pellet. HCl (32%) was added in slowly to the supernatant in a step-wise fashion, with good mixing, until pH 7. Then, the neutralized suspension was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min. The supernatant carefully removed

screened to provide nitrogen source for endo-pH, α -glucanase biosynthesis by *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 and do not affect the curdlan biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 simultaneously. Moreover, we explored the mechanism underlying high curdlan production in the AT-CFS, and the structure of curdlan was characterized. This study presents a novel strategy for curdlan biosynthesis and provides an alternative for enhancing polysaccharide production and decreasing the Mw of polysaccharide.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

Agrobacterium sp. ATCC 31749 was obtained from the Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Jiangnan University. *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 was purchased from Guangdong Microbiology Culture Center, China.

2.2. Medium

The seed medium and fermentation medium for *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were the same as those in Yu et al. (2011). The seed medium for *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) contained glucose, 20; yeast extract, 15; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5; KH_2PO_4 , 6; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8; pH 7.0. The fermentation medium for *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) contained pachyman, 20; wheat bran, 20; KH_2PO_4 , 5; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; pH 7.0. The basic fermentation medium of the AT-CFS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) contained glucose, 80; yeast extract, 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; KH_2PO_4 , 3; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5.

lent). The mobile phase was 0.1 M NaOH solution with a flow rate of 0.4 mL/min. A range of glucans with different Mws were used as standards. The standard curve was $\lg Mw = -0.1088t + 7.008$ ($R^2 = 0.9991$), where t is the elution time.

2.5. Determination of the curdlan hardness

After being washed with sterile distilled water three times, the curdlan was diluted with deionized water to a 0.2 g/L solution. The sample was heated at 55 °C for complete swelling, and then heated at 100 °C to obtain a homogeneous gel. The hardness was measured by a physical analyzer (TA. XT Plus, England).

2.6. Determination of the conversion rate of glucose to curdlan

The concentration of glucose was determined by HPLC with a C18 column (4.6 mm \times 25 cm, ID 5 μm , Shimadzu). The standard curve was $y = 142260x - 835.04$ ($R^2 = 1$), where y is the peak area, and x is the concentration of glucose. The conversion rate of glucose to curdlan was calculated by Eq. (1)

$$W(\%) = c/(c_0 - c_1) \times 100\% \quad (1)$$

where W is the conversion rate of glucose to curdlan (%), c is the curdlan production (g/L), c_0 is the concentration of initial glucose (g/L), and c_1 is the concentration of residual glucose (g/L).

2.7. Determination of the residual ammonia nitrogen

The residual ammonia nitrogen level in the medium was determined by the indophenols blue method (Weatherburn, 1967). The standard curve was $y = 5.494x - 0.0334$ ($R^2 = 0.9997$), where y is the concentration of ammonia nitrogen, and x is OD_{637} .

Please cite this article in press as: Liang, Y., et al. Enhanced production of curdlan by coupled fermentation system of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and *Trichoderma harzianum* GIM 3.442. *Carbohydrate Polymers* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.055>

G Model
CARP-11767; No. of Pages 8

ARTICLE IN PRESS

Y. Liang et al. / *Carbohydrate Polymers xxx (2016) xxx–xxx*

3

Table 1
Primers used in the RT-PCR verification.

Gene	Forward Reverse	5'-3' Sequence
------	-----------------	----------------