

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____

на тему: Біосинтез ϵ -полілізину *Streptomyces albulus*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Жолобка Олександр Віталійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Скроцька Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М.
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Харченко Є.В.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Жолобка Олександр Віталійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез ϵ -полілізину *Streptomyces albulus*

керівник роботи Скроцька Оксана Ігорівна, доцент, к.б.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28.05.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces albulus*, цільовий продукт: ϵ -полілізін, харчовий консервант

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1, 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки сушіння – 1 аркуш формату А2

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5. Автоматизація	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>1.04.21–4.04.21</i>	
2	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента</i>	<i>5.04.21–15.04.21</i>	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>10.04.21–18.04.21</i>	
4	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>15.04.21–18.04.21</i>	
5	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>19.04.21–30.04.21</i>	
6	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>26.04.21–2.05.21</i>	
7	<i>Опис технологічної схеми виробництва</i>	<i>30.04.21–9.05.21</i>	
8	<i>Контроль виробництва</i>	<i>10.05.21–16.05.21</i>	
9	<i>Автоматизація ділянки концентрування</i>	<i>10.05.21–16.05.21</i>	
10	<i>Охорона довкілля</i>	<i>17.05.21–20.05.21</i>	
11	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	<i>21.05.21–28.05.21</i>	
12	<i>Виконання графічної частини роботи</i>	<i>30.04.21–28.05.21</i>	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Жолобко О.В.

_____ (прізвище та ініціали)

Скроцька О.І.

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана дипломна робота присвячена розробленню технологічної схеми отримання порошкоподібного ϵ -полілізину штамом *Streptomyces albulus* LS-84, для використання в якості харчового консерванту.

Здатність до синтезу ϵ -полілізину виявлена у представників роду *Streptomyces*, а також у деяких штамів роду *Bacillus*. Проте найкращі синтезувальні властивості були притаманні штаму *Streptomyces albulus* LS-84 [10], оскільки синтезував максимальну концентрацію ϵ -полілізину – 32,6 г/л, при мінімальній вартості поживного середовища – 2,85 грн/л.

Технологія виробництва ϵ -полілізину містить допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних агентів, приготування підживлюючих розчинів глюкози та амоній сульфату, приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу і для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту, відділення біомаси, доочищення від флокул, виділення ϵ -полілізину, концентрування, сушіння та пакування).

Дипломний проект складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (89 найменувань), апаратурної та технологічної схеми (4 листа формат А1), та схеми автоматизації (1 лист формат А1). Загальний обсяг роботи – 124 сторінок, 7 рисунків, 27 таблиць.

Ключові слова: *Streptomyces albulus* LS-84, ϵ -полілізин, глюкоза, кукурудзяний глютен, поліамінокислота, *Streptomyces*, біосинтез, виділення, амберліт IRC-50, іонообмінна сорбція.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Жолобка О.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.				2	124
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
					Реферат		

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	7
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента..	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	19
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	27
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	28
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	33
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	33
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	34
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	37
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	37
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	37
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	39
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	40
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	42
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	47
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту.....	61
5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	62
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	66
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.	72
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	89
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	89
8.2. Мікробіологічний контроль	94
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	95
8.3.1. Концентрація біомаси.....	95
8.3.2. Концентрація цільового продукту	95
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	96
8.4. Показники якості готового продукту.....	98

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Зміст					
Розроб.		Жолобка О.В.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скряцька О.І.							3	124
Консультант								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Пирог Т.П.								

РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва.....	100
РОЗДІЛ 10 Охорона довкілля.....	105
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	105
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	109
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	109
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	110
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	111
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	113
ЛІТЕРАТУРА.....	114
Додатки.....	125

ВСТУП

На сьогоднішній день велику увагу до себе привертають поліамінокислоти, які є промислово важливими мікробними метаболітами через свої властивості.

ϵ -Полілізін, ϵ -полі-L-лізін (ϵ -ПЛ) відносить до класу поліамінокислот, яка складається з 25-30 залишків L-лізину. За рахунок своїх унікальних властивостей дана сполука може застосуватися у виробництві лікарських засобів для забезпечення кращої проникності активної сполуки лікарського засобу в клітини. Проте основну увагу дослідників ϵ -ПЛ привернув до себе за рахунок своєї високої антимікробної активності щодо широкого класу мікроорганізмів, в тому числі і збудників харчових отруєнь. Механізм дії полягає в наступного, ϵ -ПЛ за рахунок електростатичних сил адсорбується на клітинній поверхні бактерій, що призводить до зняття зовнішньої мембрани. Це призводить до нерівномірного розподілу цитоплазми, тим самим сприяючи руйнуванню бактеріальної клітини. Враховуючи, що даний механізм дії не може призвести до резистентності зі сторони патогенів, тому дану речовину рекомендують використовувати як природній харчовий консервант. При цьому варто зазначити, що відповідно до даних Управління з продовольства і медикаментів США (Food and Drug Administration, FDA) ϵ -ПЛ має низьку токсичність, є безпечним для людини, оскільки він розщеплюється до лізину і не спричиняє негативного впливу на здоров'я людини.

ϵ -ПЛ, головним чином, отримують шляхом мікробного синтезу. Одним зі шляхів реалізації ϵ -ПЛ є його використання у якості природного консерванту, який з успіхом може витіснити хімічні харчові консерванти на ринку харчової промисловості.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобка О.В.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скряцька О.І.					5	124
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Перевагою ϵ -ПЛ як харового консерванту є його висока антимікробна активність щодо збудників псування продуктів і збудників захворювання людини, окрім того дана поліамінокислота захищає харчові продукти при цьому не змінюючи їх фізико-хімічних та органолептичних показників продуктів.

Новизною роботи є оптимізація та масштабування до виробничих об'ємів, технології одержання ϵ -полілізину, який синтезується гібридним штамом *Streptomyces albulus* LS-84 у кількості 32,6 г/л з метою створення конкурентно спроможного харчового консерванту, який за рахунок своїх унікальних властивостей зможе витіснити хімічні консерванти з ринку України.

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

1.1. Фізико-хімічні властивості ϵ -полілізину

ϵ -Полілізин (ϵ -ПЛ) – поліамінокислота мономерами якої є лізин, де ϵ -аміногрупа одного лізину з'єднується з α -карбоною групою іншого лізину за допомогою пептидного зв'язку. Дана речовина розчинна у воді і є термічно стабільною, оскільки водні розчини ϵ -полілізину можна кип'ятити при 100 °С упродовж 30 хвилин або автоклавувати при 120 °С 20 хвилин і при цьому амінокислота не буде розкладатися. Проте полілізин можна розкласти ферментативним шляхом дією амідаз. Зауважимо, що ϵ -ПЛ є нетоксичною сполукою, чим і зумовлене її використання у медицині та фармацевтичній промисловості.

У 2003 році управлінням з продовольства і медикаментів (FDA) було визнано ϵ -ПЛ як безпечною харчовою добавкою. ϵ -ПЛ – також є позитивно зарядженою молекулою, яка може утворювати полімерні комплекси з іншими аніонними полімерами, який широко використовується в харчовій промисловості, як антимікробна добавка, та в медицині, для транспорту речовин [1]. ϵ -ПЛ отримують тільки мікробним шляхом як продукт бродіння.

Найбільшого поширення ϵ -ПЛ набув як протимікробний засіб проти патогенних та умовно патогенних дріжджів, грибів, грампозитивних та грамнегативних бактерій, а також у комплексі з лікарськими препаратами (ЛП) для полегшення транспорту останніх, та носій генів у вигляді гідрогелів [2].

ϵ -Полілізин, як правило, утворюється у вигляді гомополіпептиду з приблизно 25–30 L-лізинними залишками. Хімічна формула $(C_6H_{12}N_2O)_n$, молекулярна маса 4700 г/моль при ступені полімеризації – 30.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Жолобко О.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.І.				7	124
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
Розділ 1. Характеристика цільового продукту							

Структурну формулу ϵ -ПЛ зображено на рис. 1.1.

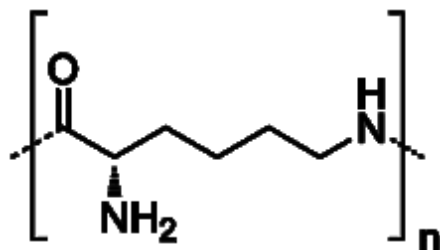


Рис.1.1. Структурна формула ϵ -полілізину.

1.2. Застосування ϵ -полілізину в промисловості

Фармакокінетичні дослідження показали, що ϵ -полілізин не накопичується в організмі і майже повністю виводиться вже через 168 год після прийому [3]. Дані дослідження засвідчують перспективи використання даної сполуки як в харчовій, так і фармацевтичній промисловості.

В останнє десятиліття було проведено ряд досліджень, спрямованих на аналіз сфер промислового застосування ϵ -полілізину.

ϵ -Полілін може бути використаний як природний антимікробний засіб у виробництві продуктів харчування. Завдяки високій антимікробній активності ефективна доза є відносно низькою. До того ж додавання ϵ -полілізину не впливає на смак їжі, тому ϵ -полілізин може поєднуватися з іншою їжею в якості харчової добавки. Крім цього, перспективним є застосування ϵ -полілізину у комплексі з декстраном та в якості двофункціональної харчової добавки, що володіє емульгуючими та антибактеріальними властивостями [3].

Як було зазначено вище, ефективним є застосування лікарських препаратів у поєднанні з ϵ -ПЛ, адже саме ця речовина сприяє кращому проникненню лікарського засобу в клітину [4]. Дана властивість зумовлена тим, що поверхня ϵ -ПЛ має катіонну форму аміногрупи, саме це може полегшити транспортування препаратів.

Наприклад, метотрексат, антифолатний агент, може бути сполучений з ϵ -полілізином і використовуватися для лікування лейкемії, саркоми та інших неопластичних захворювань. ϵ -полілізин також може використовуватися для доставки вірусних генів. Оскільки ϵ -полілізин є не тільки водорозчинним та

біорозчиним, він також може використовуватися для запобігання деградації нуклеазної кон'югованої ДНК та з метою підвищення ефективності транспортування ДНК в клітину-реципієнта.

Показано, що ϵ -ПЛ є ефективним генним вектором, наприклад, лактозно-поліетиленгліколь-полілізиновий (Lac-PEG-PL) перевізник [5].

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

Завдяки своїм властивостям ϵ -полілізин та його похідні можуть широко застосовуватися в різних галузях промисловості, серед яких харчова, а також при виготовленні електронної продукції, у медицині та у складі фармацевтичних препаратів.

Зважаючи на перспективність використання даної сполуки у промисловості актуальним є пошуки високопродуктивних продуцентів ϵ -полілізину, які будуть характеризуватися високою швидкістю росту і високою концентрацією утвореного ϵ -ПЛ на відносно дешевих середовищах.

Як зазначалось у розділі 1, ϵ -полілізин синтезується лише за допомогою мікроорганізмів, вперше його було синтезовано в 1977 році бактеріями роду *Streptomyces*. На сьогоднішній день здатність до синтезу ϵ -полілізину виявлена не тільки серед представників роду *Streptomyces*, а також у деяких штамів роду *Bacillus*.

У таблиці 2.1 наведено характеристику найбільш відомих продуцентів ϵ -полілізину.

Streptomyces albulus-PD-1-*amtB* – генетично-модифікований штам, який був створений на основі *S. albulus* PD-1 шляхом перенесення гену *amtB*, що відповідає за збільшення активності метаболічних шляхів, які відповідають за метаболізм амонію. Штам володіє високими показниками синтезу ϵ -ПЛ 35,7 г/л, і має невелику, порівняно з іншими продуцентами, тривалість культивування [6].

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобко О.В.					10	124
Перевір.		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Проте *Streptomyces albulus* M-Z18 , який є природнім штамом, утворює зазначену полі-амінокислоту у досить високих концентраціях 39,84 г/л, однак його недоліком є значна тривалість культивування – 192 год, що на порядок вище порівняно з іншими продуцентами (96-120 год) [7].

Streptomyces diastatochromogenes 6#-7 – в порівнянні з *Streptomyces albulus* M-Z18 синтезує порівняно невеликі кількості синтезованого ϵ -ПЛ 25,5 г/л за 120 год вирощування даного штаму на середовищі з глюкозою [8].

Bacillus licheniformis PL26 – синтезує найменшу кількість ϵ -ПЛ 0,2 г/л, проте його перевагою є використання в якості субстрату відходи біодизельного виробництва – технічний гліцерин [9].

Streptomyces albulus LS-84 – природній штам, який утворює до 32,6 г/ ϵ -полілізину за умови росту на середовищі з глюкозою і кукурудзяним глютенном [10].

З даних, наведених в табл.2.1, варто зробити наступний висновок: використання штамів *Streptomyces diastatochromogenes* 6#-7 і *Bacillus licheniformis* PL26 як основних продуцентів ϵ -полілізину не є доцільним, оскільки штам *S. diastatochromogenes* 6#-7 використовує такий же ростовий субстрат як і інші продуценти, але утворює у менших кількостях цільовий продукт. У свою чергу, *B. licheniformis* PL26 використовує, як ростовий субстрат технічний гліцерин, що є перевагою, але синтезує приблизно в 100 разів менше ϵ -ПЛ .

Зазначимо, що для вибору кращого продуцента, даних, наведених в табл. 2.1, не достатньо. Надалі критерієм порівняння було обрано вартість поживного середовища для культивування обраних біологічних агентів.

У таблиці 2.2 наведено вартість компонентів поживного середовища для продуцентів ϵ -ПЛ.

Порівняльна характеристика продуцентів ϵ -полілізину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація ϵ -полілізину, г/л	Час культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Streptomyces albulus</i> -PD-1- <i>amtB</i>	Глюкоза – 50; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 10; дріжджовий екстракт – 5; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5; K ₂ HPO ₄ – 0,8; KH ₂ PO ₄ – 1,36; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03; ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,04.	35,7	168	Культивування в ферментері об'ємом 5 л (t = 30°C, 200 об/хв.) Підтримання джерела вуглецю на рівні 10 г/л (шляхом внесення глюкози)	Xu D., Yao H., Cao C., Xu Z., Li S. Enhancement of ϵ -poly-l-lysine production by overexpressing the ammonium transporter gene in <i>Streptomyces albulus</i> PD-1. <i>Bioprocess and Biosystems Engineering</i> . 2018, 41(9): 1337–1345. doi: 10.1007/s00449-018-1961-9.
<i>Streptomyces albulus</i> M-Z18	Гліцерин/глюкоза – 60 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 8 дріжджовий екстракт – 10 KH ₂ PO ₄ – 5 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 2 FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1	39,84	192	Культивування в ферментері об'ємом 5 л (t = 30°C, 200 об/хв, pH 4,00.) При концентрації глюкози нижче 10 г/л вноситься (800 г/л глюкози, або 1200 г/л гліцеролу)	Chen X.S., Wang K.F., Zheng G.C., Gao Y., Mao Z.G. Preparation, characterization and antimicrobial activity of ϵ -poly- l -lysine with short chain length produced from glycerol by <i>Streptomyces albulus</i> . <i>Process Biochemistry</i> . 2018, 68: 22–29. doi: 10.1016/j.procbio.2018.03.001

<p><i>Streptomyces diastatochromogenes</i> 6#-7</p>	<p>Глюкоза – 50; (NH₄)₂SO₄ – 10; дріжджовий екстракт – 5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,5; K₂HPO₄ · 3H₂O – 0,8; KH₂PO₄ – 1,36; FeSO₄ · 7H₂O – 0,03; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,04.</p>	<p>25,5</p>	<p>120</p>	<p>Культивування в ферментері об'ємом 5 л (t = 30°C, pH 4,00.) Внесення глюкози як додаткового джерела вуглецю (вносять коли рівень глюкози стає нижчим 10 г/л)</p>	<p>Guo F., Zheng H., Cheng Y., Song S., Zheng Z., Jia S. Medium optimization for ε-poly-L-lysine production by <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> using response surface methodology. <i>Letters in Applied Microbiology</i>. 2018, 66(2): 124–131. doi: 10.1111/lam.12812.</p>
<p><i>Bacillus licheniformis</i> PL26</p>	<p>Технічний гліцерин – 20; (NH₄)₂SO₄ – 10; дріжджовий екстракт – 5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,5; K₂HPO₄ – 0,8; KH₂PO₄ – 1,36; FeSO₄ · 7H₂O – 0,03; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,04.</p>	<p>0,2</p>	<p>96</p>	<p>Культивування в колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл (t = 37°C, 220 об/хв, pH 8,9</p>	<p>Bhattacharya S., Dubey S., Singh P., Shrivastava A., Mishra S. Biodegradable Polymeric Substances Produced by a Marine Bacterium from a Surplus Stream of the Biodiesel Industry. <i>Bioengineering</i>. 2016, 3(4): 34. doi: 10.3390/bioengineering3040034.</p>

<p><i>Streptomyces albulus</i> LS-84</p>	<p>Глюкоза – 50; (NH₄)₂SO₄ – 10; Кукурудзяний глютен – 20; MgSO₄ · 7H₂O – 0,5; K₂HPO₄ – 0,8; KH₂PO₄ – 1,36; FeSO₄ · 7H₂O – 0,03; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,04.</p>	<p>32,6</p>	<p>196</p>	<p>Культивування в ферментері об'ємом 5 л (t = 30°C, pH 3,8) Внесення додаткового джерела вуглецю (10 г/л після 40 год культивування кожні 20 годин) і джерела азоту (0,2-0,3 г/л)</p>	<p>Shu Li, Nan Wang, Zong-Jun Du, Guan-Jun Chen. Intergeneric Hybridization between <i>Streptomyces</i> <i>albulus</i> and <i>Bacillus subtilis</i> Facilitates Production of ε-Poly-L-lysine from Corn Starch Residues. <i>Biotechnology</i> <i>and Bioprocess Engineering</i>. 2018, 23: 580-587. doi: 10.1007/s12257-018- 0253-1</p>
--	--	-------------	------------	--	---

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Streptomyces albulus-PD-1-*amtB*, *Streptomyces albulus* M-Z18 та *Streptomyces
albulus* LS-84**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4, 5)*
<i>Streptomyces albulus</i> -PD-1- <i>amtB</i>	Глюкоза – 50;	36	1,8	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 10;	46,65	0,467	2
	Дріжджовий екстракт – 5;	541,50	2,707	5
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5;	10,20	0,005	4
	K ₂ HPO ₄ – 0,8;	177	0,141	5
	KH ₂ PO ₄ – 1,36;	68,10	0,093	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03;	3	0,0001	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,04.	80	0,0032	3
Вартість 1 л середовища – 5,22 грн				
<i>Streptomyces albulus</i> M-Z18	гліцерин/глюкоза – 60	36	2,16	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 8	46,65	0,373	2
	дріжджовий екстракт – 10	541,50	5,415	5
	KH ₂ PO ₄ – 5	68,10	0,326	5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 2	10,20	0,020	4
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,1	3	0,0003	1
Вартість 1 л середовища – 8,30 грн				
<i>Streptomyces albulus</i> LS-84	глюкоза – 50;	36	1,8	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 10;	46,65	0,467	2
	Кукурудзяний глютен – 20;	16,50	0,33	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5;	10,20	0,005	4
	K ₂ HPO ₄ – 0,8;	177	0,141	5
	KH ₂ PO ₄ – 1,36;	68,10	0,093	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03;	3	0,0001	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,04.	80	0,0032	3
Вартість 1 л середовища – 2,85 грн				

Примітка: * – Ціни вказано станом на квітень 2020 р. 1. <https://flagma.ua/>, 2. <http://rushim.ru/>, 3. <https://prom.ua/>, 4. <https://him-component.com.ua/>, 5. <https://www.sigmaaldrich.com/>

З даних, наведених в табл. 2.2, зрозуміло, що *S. albulus* LS-84 має найнижчу вартість 1 л поживного середовища 2,85 грн, а вартість поживного

середовища для *S. albulus* M-Z18 і *S. albulus*-PD-1-*amtB* більше у 2 і 3 рази відповідно, але і цих даних не достатньо для остаточного вибору продуцента.

Для того, щоб повністю бути впевненим, що обраний мікроорганізм є кращим біологічним агентом, необхідно розрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту і кількість утвореного ϵ -ПЛ за годину.

Порівняння вартості 1 г ϵ -ПЛ у *S. albulus* LS-84, *S. albulus* M-Z18 та *S. albulus*-PD-1-*amtB* наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту ϵ -полілізину при культивуванні *Streptomyces albulus*-PD-1-*amtB*, *Streptomyces albulus* M-Z18 та *Streptomyces albulus* LS-84

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація ϵ -полілізину, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного ϵ -полілізину за годину, г/год
<i>Streptomyces albulus</i> -PD-1- <i>amtB</i>	5,22	35,7	0,14	168	0,21
<i>Streptomyces albulus</i> M-Z18	8,30	39,84	0,20	192	0,20
<i>Streptomyces albulus</i> LS-84	2,85	32,6	0,087	196	0,16

Підсумовуючи вищезазначене можна зробити висновок, що *S. albulus*-PD-1-*amtB* є перспективним продуцентом ϵ -ПЛ, оскільки утворює найбільшу кількість цільового продукту за годину, однак цього недостатньо, адже вартість 1 г цільового продукту дещо вища, у порівнянні з іншими продуцентами. Найкращі показники синтезу і вартості ϵ -ПЛ притаманні *S. albulus* LS-84, а саме найменшу умовну вартість 1 г цільового продукту і найвищу концентрацію ϵ -ПЛ за годину, в той час як *S. albulus* M-Z18 синтезує менше полі-амінокислоти і вартість її вища.

Отже, в якості основного продуцента ϵ -полілізину, доцільно обрати *S. albulus* LS-84, через високу концентрацію синтезу даної речовини і невисоку вартість цільового продукту в порівнянні з іншими продуцентами.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Визначення вмісту азоту

Дано:

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 10 \text{ г/л};$$

$$M((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 132 \text{ г/моль};$$

$$Ar(\text{N}_2) = 28 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення азоту:

$$\frac{Ar(\text{N}_2) \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}{M((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)} = \frac{28 \times 10}{132} = 2,12$$

Також відомо що в кукурудзяному глютені вміст азоту 10% тобто з 20 г/л ми отримуємо 2 г/л азоту, отже, сумарний вміст азоту $2,12 + 2 = 4,12$.

Знаючи те, що в клітині азоту знаходиться 10% від усіх компонентів, тому щоб дізнатися концентрацію біомаси, отримане значення необхідно перерахувати:

$$4,12 \times 10 = 41,2 \text{ г/л}$$

Отже, теоретично можлива концентрація біомаси за азотом дорівнює 41,2 г/л.

Визначення вмісту вуглецю

Дано:

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 50 \text{ г/л};$$

$$M(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 180 \text{ г/моль};$$

$$Ar(\text{C}_6) = 72 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення вуглецю:

$$\frac{Ar(\text{C}_6) \times \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}{M(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)} = \frac{72 \times 50}{180} = 20$$

Знаючи те, що в клітині вуглецю знаходиться 50% від усіх компонентів, тому щоб дізнатися концентрацію біомаси, отримане значення необхідно

перерахувати:

$$20 \times 2 = 40 \text{ г/л}$$

Тоді теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем дорівнює 40 г/л.

З наведених вище розрахунків можна сказати, що вуглець в даному середовищі є лімітуючим фактором. Тобто при споживанні всього вуглецю ріст мікроорганізмів припиниться. А це означає, що середовище даного кількісного складу використовувати недоцільно.

Для того, щоб в середовищі наведеного складу азот використався повною мірою, необхідно збільшити кількість внесеного вуглецю. Цю кількість можна розрахувати з пропорції. Вуглець відноситься до азоту як $\frac{5}{1}$ тобто вуглецю необхідно в 5 разів більше:

$$4,12 \times 5 = 20,6 \text{ г/л}$$

Необхідно 20,6 г/л вуглецю для повного використання азоту.

За пропорцією дізнаємося скільки потрібно додати в середовище глюкози:

$$\frac{Ar(C_6) \times C_6H_{12}O_6}{M(C_6H_{12}O_6)} = \frac{72 \times X}{180} = 20,6$$

$$72 \times X = 180 \times 20,6$$

$$X = \frac{180 \times 20,6}{72} = 51,5 \text{ г/л}$$

Для повного використання джерела азоту в середовищі має бути 51,5 г/л глюкози. А оскільки було задано 50 г/л, то до цієї кількості потрібно додати ще 1,5 г/л.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Streptomyces albulus*

Морфолого-культуральні ознаки.

На сьогоднішній день загальної морфологічної характеристики для *Streptomyces albulus* LS-84 немає тому розглянемо морфолого-культуральну характеристику для представників роду *Streptomyces* в цілому. Представники даного роду це аеробні, грампозитивні нитчасті бактерії, які продукують добре

розвинені вегетативні гіфи (діаметром від 0,5 до 2,0 мкм) з гілками. Вони утворюють складний субстратний міцелій, який допомагає вилучити органічні сполуки з їх субстратів. Хоча міцелії та повітряні гіфи, що виникають з них, є рухливими, рухливість досягається розпорошенням спор [11]. Споріві поверхні можуть бути волохатими, грубими, гладкими, колючими або бородавчастими, у деяких видів повітряні гіфи складаються з довгих прямих ниток. Деякі штами утворюють короткі ланцюжки спор на субстратних гіфах.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Для характеристики фізіолого-біохімічних ознак розглянемо *S. albulus* 436, який також є продуцентом ϵ -полілізину. Росте при 25-35 °С, оптимальна температура росту 30 °С. Колір субстратного міцелію, як правило, блідо жовтий, але якщо ріст відбувається на тирозиновому агарі або гліцерино-аспарагіновому агарі колір буде жовтувато-коричневий. Повітряний міцелій характерний при рості на тирозиновому агарі та деяких інших подібних ростових субстратах на всіх інших наявність повітряного міцелію не спостерігається. Зрілий спорульований повітряний міцелій зазвичай сірого або сірувато-коричневого кольору [12].

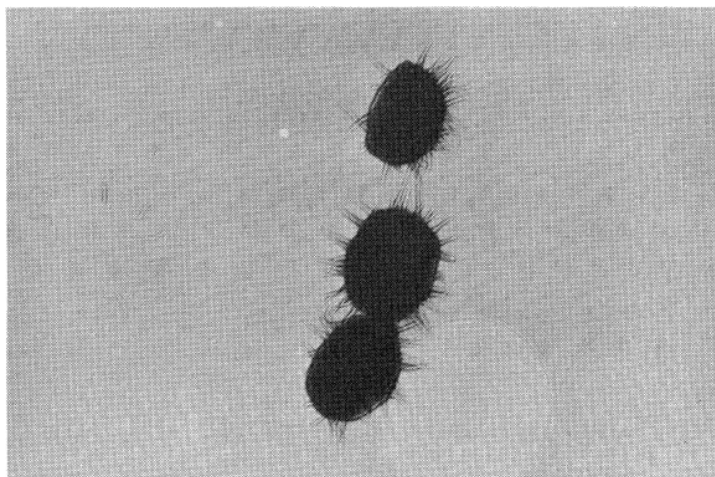


Рис.2.1. Електронна мікрофотографія спор штаму No 346. Колюча поверхня (x 10000).

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Streptomyces albulus* LS-84 наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій

[13].

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Actinobacteria*

Клас – *Actinobacteria*

Родина – *Streptomycetaceae*

Рід – *Streptomyces*

Вид – *Streptomyces albulus*

Штам - *Streptomyces albulus* LS-84

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

ϵ -Полілізін (ϵ -ПЛ) – поліамінокислота, мономерами якої є лізін. Це природна харчова добавка з антимікробними властивостями, яка є ефективною у запобіганні псуванню продуктів, не є токсичною та не впливає на смак і запах продуктів. Окрім того дану сполуку можна використовувати як допоміжну речовину при фармацевтичному виробництві, оскільки за рахунок катіонної форми аміногрупи цієї поліамінокислоти, ϵ -ПЛ забезпечує краще проникнення лікарського засобу в клітини-мішені.

3.1.1 ϵ -ПЛ як фунгіцидний препарат

Як фунгіцид ϵ -ПЛ проявляє найвищу інгібуючу дію щодо *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* та інші [14, 15].

Penicillium digitatum – мезофільний гриб, який є найбільш поширеним руйнівним збудником гниття цитрусових фруктів, так званої зеленої цвілі. Після збору врожаю приблизно 90% виробничих втрат спричинені даним мікроорганізмом [16]. Незважаючи на застосування синтетичних фунгіцидів, які на сьогоднішній день є дуже поширеними, зелена цвіль залишається основною проблемою імпортерів цитрусових, оскільки доводиться часто змінювати синтетичні фунгіциди з метою уникнення резистентності *P. digitatum* до них. Враховуючи високий рівень зараження фруктів збудником зеленої цвілі, у всьому світі залишається невирішеним питання продовження терміну зберігання цитрусових продуктів та пошуки ефективних методів боротьби з *P. digitatum*.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобка О.В.			Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.					21	124
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Використання хімічних фунгіцидів має ряд недоліків через те, що більшість синтетичних речовин надовго не затримуються на ринку, тому більшість з них не має доказової бази стосовно безпечності і впливу на організм людини, тобто споживача, а також навколишнє середовище.

В роботі [14] вченими було описано методику обробки цитрусових фруктів *in vivo* для боротьби з *P. digitatum*. Таким чином експериментальним шляхом було встановлено, що оптимальною дозою, для захисту лимонів від уражень, спричинених *P. digitatum*, є використання 20 мл розчину ϵ -ПЛ з концентрацією активної речовини 3,2 г/л. Тобто для одного фрукту необхідно 64 мг або 0,064 г ϵ -ПЛ.

Відповідно до даних Державної фіскальної служби, імпорт цитрусових в Україну на 2018 рік всього становив 337,87 тон [17]. Прийmemo, що розчином ϵ -ПЛ буде оброблюватися 1% цитрусових від загальної кількості імпортованих в Україну. Вихідні дані для розрахунку річної потреби ϵ -ПЛ наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в ϵ -ПЛ, для цитрусових

Цитрусовий фрукт	Відсоткове співвідношення по кількості завезених цитрусових	Перерахунок відсотків в тони від загальної кількості, тон	Середній розмір, г	Приблизна кількість фруктів, шт	Необхідна кількість ϵ -ПЛ, мг
Апельсин	35%	118,25	175 г	675 714	43 245 696
Мандарин	37%	125,01	70 г	1 785 857	11 4294 848
Лимон	22%	74,33	120 г	619 416	39 642 624
Грейпфрут	6%	20,27	450 г	45 044	2 882 816
Всього:				3 126 031	200 065 984

3.1.2 Потреба в ϵ -ПЛ для використання як харчового консерванту

На сьогоднішній день великий сегмент сільськогосподарської продукції як в Україні, так і у світі, стає щороку непридатним через неправильне зберігання та погіршення стану внаслідок ферментативної активності фітопатогенних мікроорганізмів або іншими зовнішніми факторами. В свою чергу мікробне забруднення продуктів харчування призводить до спалахів

харчових отруєнь серед споживачів. Тому з метою запобігання харчових отруєнь продукти почали обробляти хімічними консервантами, які збільшують термін придатності та пригнічують розвиток сторонньої мікробіоти. Проте з кожним роком суспільство починає перейматися через використання хімічних консервантів, які можуть бути токсичними та можуть проявляти небажані ефекти на організм людини.

Враховуючи, що ϵ -полілізин є природньою сполукою, нетоксичною, безпечною та розкладається на лізин, який є цілковито безпечним, у 2004 році Управління з продовольства і медикаментів США (Food and Drug Administration – FDA) затвердило ϵ -PL як безпечний харчовий консервант, а його застосування, в свою чергу, дозволить зменшити на ринку частку хімічних консервантів.

Розглянемо декілька сфер застосування ϵ -PL.

1. Використання в морських продуктах.

Морські продукти швидко псуються внаслідок окислення ліпідів ненасичених жирних кислот, які каталізуються іонами металів та гематичними сполуками. Більше того, на якість морепродуктів серйозно впливає мікробне забруднення та в наступному ріст сторонньої мікробіоти, а також втрата білкової активності морських продуктів.

В роботі [18] зазначено, що використання ϵ -PL з морськими продуктами призводить до пригнічення наступних видів мікроорганізмів *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, бактерій роду *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, *Escherichia coli*. Проте варто зазначити, що для кожного виду риби використовується різна концентрація ϵ -PL. Обробка морських продуктів відбувається обприскуванням або зануренням в розчин з концентрацією 1000 – 5000 грам на тону продукту.

2. Використання в м'ясних продуктах.

Через окислення ліпідів м'ясні продукти стають чудовим середовищем для розвитку сторонньої мікробіоти, що призводить до неприємного запаху та гіркого присмаку продукту. *Escherichia coli* O157: H7 вважається дуже

поширеним і небезпечним збудником, який призводить до харчового отруєння навіть за невеликої кількості збудника. В ході досліджень, описаних в роботі [19], було встановлено, що комплексне використання нізину та ϵ -PL проявляє високу антимікробну активність до *E. coli*, *B. subtilis* *S. aureus*.

Таким чином, ϵ -ПЛ може пригнічувати ріст патогенних бактерії тим самим зменшуючи відсоток зіпсованих м'ясних продуктів під час зберігання. В роботі [20] вченими зазначається, що оптимальні дози для пригнічення росту мікроорганізмів та продовження терміну зберігання м'ясних продуктів є 0,125 г/кг нізину + 0,125 г/кг ϵ -ПЛ та 0,5 г/кг ϵ -ПЛ для м'яса курки та сосисок відповідно.

3. Використання в молочних продуктах.

Йогурт є одним з найпопулярніших молочних продуктів у всьому світі, але його закислення, що спричинене активністю *Lactobacillus bulgaricus* та *Streptococcus thermophiles* внаслідок бродіння, значно скорочує термін його зберігання. В роботі [21] ϵ -ПЛ додавали в різних концентраціях до йогуртової суміші, яку виробляли та інокулювали з *L. bulgaricus* та *S. thermophiles*. У оброблених ϵ -ПЛ групах показники кислотності йогурту були значно нижчими ($p < 0,05$) у порівняно з показниками кислотності у контролі. Зразки, оброблені 0,005% ϵ -ПЛ показали кращу профілактику контамінації після закислення йогурту, найкращий смак, колір, відчуття в роті та зовнішній вигляд упродовж зберігання в холодильнику протягом 20 днів.

Також досліджували антибактеріальну активність ϵ -ПЛ щодо *L. monocytogenes in vitro*, а також *in vivo* [22]. В ході експерименту *in vivo* 1 мг/мл ϵ -ПЛ розпорошували на зразки сиру, попередньо оброблені *L. monocytogenes*, і поміщають у стерильні поліетиленові пакети при 4 і 25 °C на 15 днів. В ході дослідження було показано, що за обробки сиру ϵ -ПЛ пригнічення росту *L. monocytogenes* спостерігалось неозброєним оком. Крім того, ϵ -ПЛ не суттєво вплинув на зовнішній вигляд сиру, смак та загальну прийнятність. Результати показали, що ϵ -ПЛ може не тільки збільшувати термін зберігання сиру, але й зберігати якість його органолептичних показників.

В табл. 3.2 наведено вихідні дані для розрахунку потреби в ϵ -ПЛ для використання його як харчового консерванту з метою запобігання псуванню харчових продуктів.

Таблиця 3.2

Вихідні дані для розрахунку річної потреби ϵ -ПЛ в якості консерванту для харчових продуктів

Категорія	Оброблюваний продукт	Оптимальна доза обробки ϵ -ПЛ	В Україні виробляють кількість		Необхідна кількість ϵ -ПЛ, г	Літературне джерело по використанню продукту
			Імпорт свіжої або охолодженої риби	Експорт філе риби та інше м'ясо риб		
Морські продукти	Риба	1000-5000 г/т	22 537 (т)	3 707 (т)	78 732 000	[23]
			Імпорт свіжої або охолодженої риби			
Молочні продукти	Сир	1 г/кг	128 000 т (2019)		128 000 000	[24]
	Йогурт	0,005%	136 000 тон.		6 800 000	
М'ясні продукти	М'ясо Курки	0,125 г/кг нізину + 0,125 г/кг ϵ -ПЛ	237 000 т. тушки 388 000 т. частин на тушок (2019)		78 125 000	[24]
	Сосиски	0,5 г/кг	230 000 т. (2019)		115 000 000	
Всього					406 657 000	

Враховуючи, що ϵ -ПЛ буде оброблятися лиш 1% продуктів, наведених в табл. 3.1 та табл. 3.2, тому розрахунок річної потужності ϵ -ПЛ для використання його як харчового консерванту, представлено у вигляді схеми на рис. 3.1.

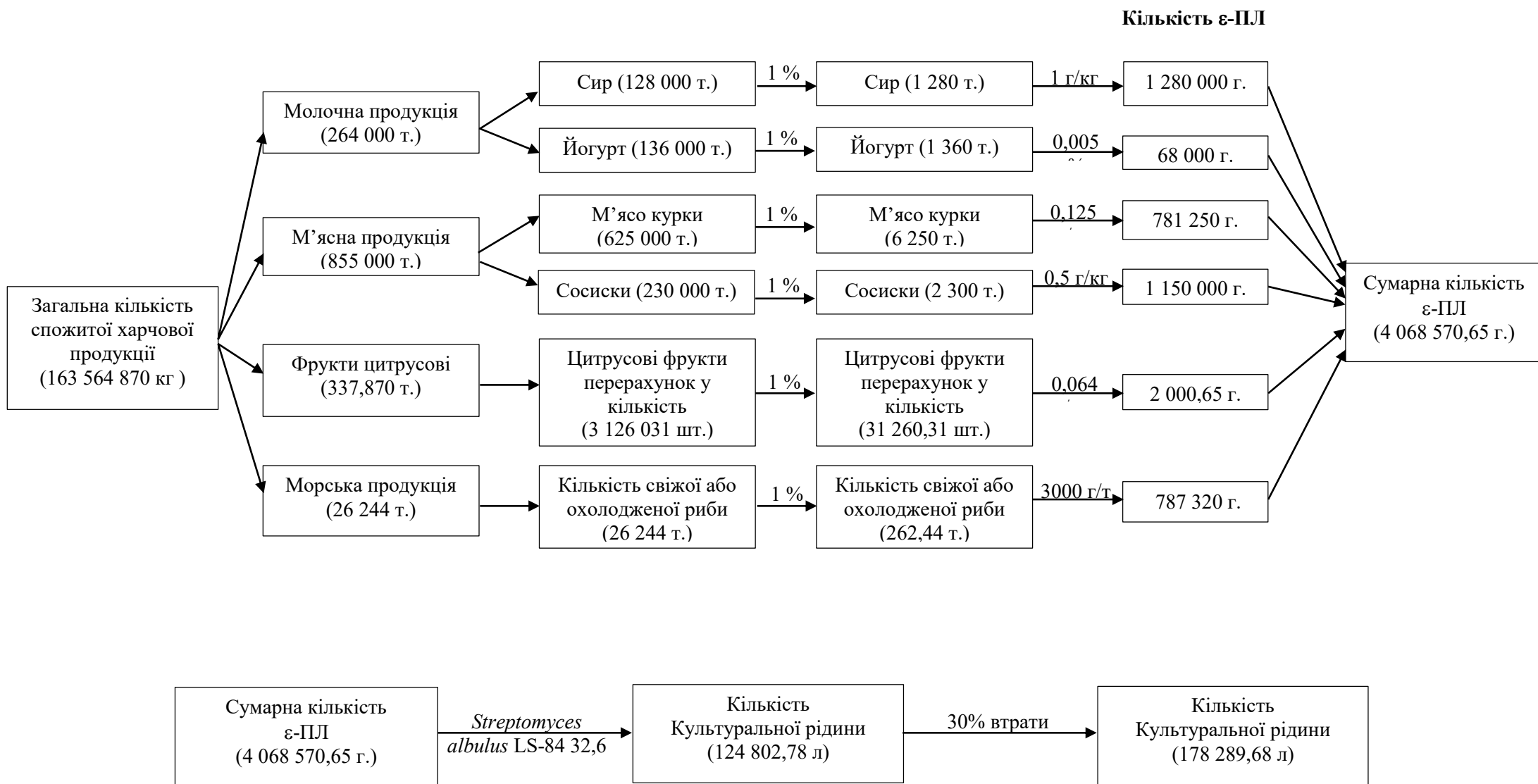


Рис. 3.1. Узагальнена схема розрахунку культуральної рідини для біосинтезу ε-полілізину *Streptomyces albulus* LS-84

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для подальших розрахунків сумуємо дані з таблиці 3.1 і таблиці 3.2, для обробки цитрусових доцільніше прийняти 1% від загальної кількості, тобто 2 000,65 г, та для використання в якості консерванту (для морських, молочих та м'ясних продуктів) доцільно прийняти 1% від загальної кількості, що складає 4 066 570 г, отже загальна потреба складає:

$$2\,000,65 + 4\,066\,570 = 4\,068\,570,65 \text{ г}$$

Дану кількість ϵ -ПЛ можна отримати при культивуванні гібридного штаму *Streptomyces albulus* LS-84, який продукує 32,6 г/л цієї речовини за 196 годин [12]. Тому для отримання 4 068 570,65 г ϵ -полілізину необхідна наступна кількість культуральної рідини:

$$B = \frac{4\,068\,570,65}{32,6} = 124\,802,78 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (30%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$C = \frac{124\,802,78}{1-0,3} = 178\,289,68 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Розрахуємо кількість культуральної рідини, яку необхідно отримати за цикл ферментації, для подальшого розрахунку кількості стадії приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 320, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{178\,289,68}{320} = 557,15 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 557,15 * 203}{24} = 5\,183,86 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (196 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,1$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год),

охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

5 784,38 л культуральної рідини ($V_{\text{цк}}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\Gamma} = \frac{V_{\text{пц}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5\,183,86}{0,6} = 8\,639,77 \text{ л,}$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\Gamma} = 10 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{пц}}}{V_{\Gamma}} = \frac{5\,183,86}{10\,000} = 0,51$, не перевищує задане значення, отже дане значення залишаємо незмінним.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримуємо $V_{\text{пц}} = 5\,183,86$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{5\,183,86}{1 - 0,1} = 5\,759,84 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}}=0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5\,759,84}{0,6} = 9\,599,73 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\phi} = 10 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\phi}} = \frac{5\,759,84}{10\,000} = 0,57$$

Так як виробничий біосинтез буде відбуватись з дробним внесенням джерела вуглецю необхідно провести розрахунок підживлення.

Розрахунок підживлення

Кінцева кількість культуральної рідини $V_{\text{р}} = 5\,759,84$ для зручності розрахунку візьмемо 5 760 л

Кінцева концентрація джерела вуглецю $C_k = 360$ г/л (кг/м³)

Початкова концентрація джерела вуглецю $C_n = 51,5$ г/л (кг/м³) для зручності розрахунку візьмемо 52 г/л

Концентрація розчину підживлення $C_{ж} = 400$ г/л (кг/м³)

Кількість етапів підживлення $n = 8$

$$360 \text{ г/л} - 52 \text{ г/л} = 308 \text{ г/л}$$

$$308 \text{ г/л} / 8 = 38,5 \text{ г/л за одне внесення підживлюючого розчину}$$

$$\text{Поживне середовище без посівного матеріалу } 5760 / 1,1 = 5\,236 \text{ л}$$

$$5,236 \text{ л} \times 308 \text{ г/л} \times 100 / 40 = 4\,031,72 \text{ л води на піджив розчин}$$

$$5\,236 - 4\,031,72 = 1\,204,28 \text{ л води на поживне середовище}$$

$52 \text{ г/л} \times 5,236 \text{ л} \times 100 / 40 = 680,68 \text{ л води на розчин глюкози в поживному середовищі}$

$1\,204,28 \text{ л} - 680,68 \text{ л} = 523,6 \text{ л води на інші компоненти в поживному середовищі}$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1+E_{\phi 1}} = \frac{5\,759,84}{1+0,1} = 5\,236,21 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5\,759,84 - 5\,236,21 = 523,63 \text{ л}$$

Для одержання 523,63 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\phi 2}} = \frac{523,63}{1-0,1} = 581,81 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{\phi 1}$), що становить:

$$V_{\phi 1} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{581,81}{0,6} = 969,68 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\phi 1} = 1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi 1}} = \frac{581,81}{1000} = 0,58$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора ($E_{\phi 3}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1+E_{\phi 3}} = \frac{581,81}{1+0,1} = 528,91 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 581,81 - 528,91 = 52,9 \text{ л}$$

Для одержання 52,9 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 3}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\phi 2}} = \frac{52,9}{1-0,1} = 58,77 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}}=0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{\phi 2}$), що становить:

$$V_{\phi 2} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{58,77}{0,6} = 97,95 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\phi 2} = 0,1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\phi 1}} = \frac{58,77}{100} = 0,58$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора ($E_{\phi 4}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1+E_{\phi 4}} = \frac{58,77}{1+0,1} = 53,42 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 58,77 - 53,42 = 5,35 \text{ л}$$

Для одержання 5,35 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 4}$), які

становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\text{ф4}}} = \frac{5,35}{1-0,1} = 5,94 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}}=0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{\text{ф2}}$), що становить:

$$V_{\text{ф3}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5,94}{0,6} = 9,9 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{ф3}} = 0,01 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{ф3}}} = \frac{5,94}{10} = 0,59$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора ($E_{\text{ф4}}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1+E_{\text{ф4}}} = \frac{5,94}{1+0,1} = 5,4 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 5,94 - 5,4 = 0,54 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм4}} = 0,54 \text{ л}$ можна одержати культивуванням *S. albulus* LS-84 у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{540}{750 * 0,2} = 3,6$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ϵ -ПЛ у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 відбуватиметься у чотири етапи (див. табл. 3.3)

Узагальнені дані розрахунку техніко-економічного обґрунтування

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{г}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л
1	10 000	0,57	5 759,84	1 204,28	523,63
2	1 000	0,58	581,81	528,91	52,9
3	100	0,58	58,77	53,42	5,35
4	10	0,59	5,94	5,4	0,54
5	0,750	0,2	0,15	0,54	0,054

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом для біосинтезу ϵ -полілізину за допомогою *Streptomyces albulus* LS-84 є глюкоза [10]. Схему метаболізму глюкози *S. albulus* LS-84 у KEGG не наведено, тому розглянемо метаболізм спорідненого мікроорганізму – *Streptomyces albulus* NK660 [26].

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрі – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для штаму *S. albulus* NK660, наводимо схему перетворення глюкози (рис. 4.1).

Глюкоза за участю глюкокінази [КФ: 2.7.1.2] перетворюється на глюкозу-6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомеразі (КФ 5.3.1.9) перетворюється на фруктозу-6-фосфат.

Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктози-6-фосфат у фруктозу-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на фруктозу-1,6-дифосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомеразі (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат .

До подальшого катаболізму заключається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-дифосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобко О.В.			Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скряцька О.І.					33	124
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

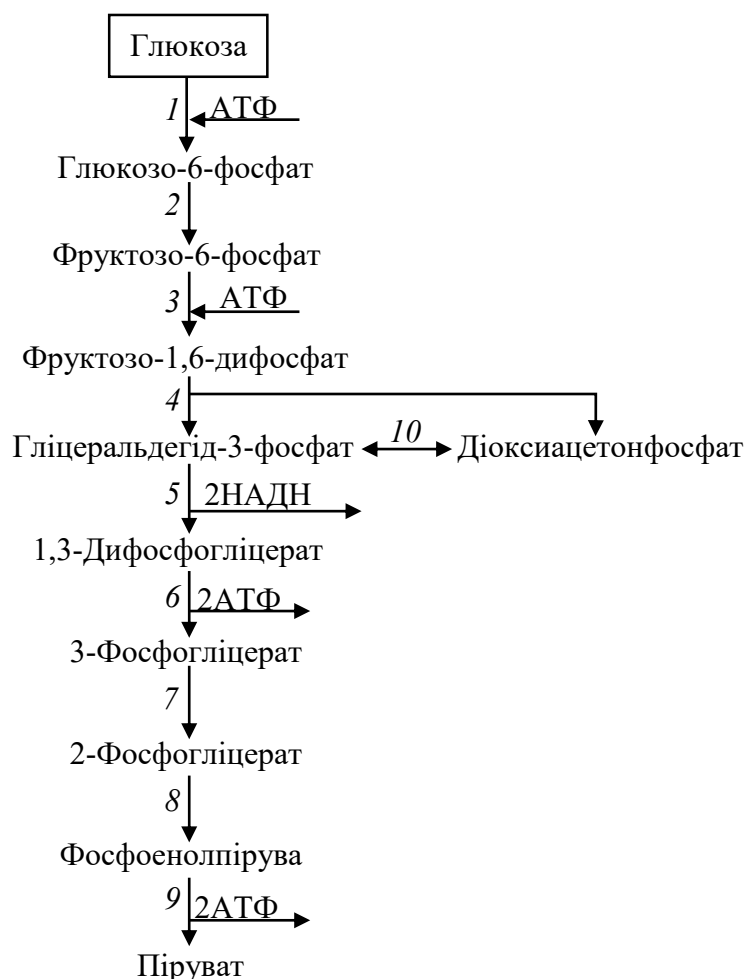


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти: 1- Глюкокіназа [КФ: 2.7.1.2]; 2- Глюкозо-6-фосфатна ізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 3-АТФ-залежна фосфотруктокіназа [КФ: 2.7.1.11]; 4- Фруктоза-бісфосфатна альдолаза, клас II [КФ: 4.1.2.13]; 5- Гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 6- Фосфогліцерат-кіназа [КФ: 2.7.2.3]; 7- 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератна мутаза [КФ: 5.4.2.11]; 8- Енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 9- Піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40]; 10- Тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *S. albulus* NK660 з використанням глюкози як джерела вуглецю внаслідок катаболізму глюкози утворюється піруват, який далі за

допомогою піруватдегідрогенази перетворюється на ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Реакції перетворення в ЦТК відбуваються за наступним шляхом цитрат, ізоцитрат, 2-оксоглутарат, сукциніл-КоА, сукцинат, фумарат, малат, оксалоацетат, з участю наступних ферментів цитратсинтази [КФ: 2.3.3.1], аконітат гідратази [КФ: 4.2.1.3], ізоцитратдегідрогенази [КФ: 1.1.1.42], 2-оксокислото фередоксин оксидоредуктази субодиниці альфа [КФ: 1.2.7.11], бета-субодиниці сукциніл-КоА синтетази [КФ: 6.2.1.5], сукцинатдегідрогенази [КФ: 1.3.5.1], фумаратгідратази [КФ: 4.2.1.2] та малатдегідрогенази [КФ: 1.1.1.37], відповідно.

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення втрат інтермедіатів ЦТК – попередників біосинтезу амінокислот, при рості на глюкозі є реакції, які каналізують ферменти фосфоенолпіруват карбоксикіназа [КФ: 4.1.1.49], малатдегідрогеназа (декарбоксилювання) [КФ: 1.1.1.39] та піруват карбоксилаза [КФ: 6.4.1.1].

Аспарат, який є амінокислотою аспаратної родини, утворюється з оксалоацетату за допомогою аспаратамінотрансферази [КФ: 2.6.1.1].

Під дією аспаратакінази [КФ: 2.7.2.4] аспарат перетворюється на 4-фосфо-L-аспарат який подальше перетворюється на аспарат бета-півалдегід за участю аспарат-напівалдегіддегідрогенази [КФ: 1.2.1.11].

4-Гідрокси-тетрагідродіпіколінатна синтаза [КФ: 4.3.3.7] активує перетворення аспарат бета-півалдегіду на (2S,4S)-4-гідрокси-2,3,4,5-тетрагідродіпіколінат, який під дією 4-гідрокси-тетрагідродіпіколінат редуктаза [КФ: 1.17.1.8] перетворюється на 2,3,4,5-Тетрагідродіпіколінат.

Далі реакції відбуваються за наступним шляхом 2,3,4,5-тетрагідродіпіколінат, N-сукциніл-2-L-аміно-6-оксогептандіоат, N-сукциніл-LL-2,6-діаміногептандіоат, LL-2,6-діаміногептандіоат, мезо-2,6-діаміногептандіоат, лізин, за допомогою 2,3,4,5-тетрагідропіридин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинілтрансферази [КФ: 2.3.1.117], N-сукцинілдіамінопімелат амінотрансферази [КФ: 2.6.1.17], 29-сукцинілдіамінопімелатдесцинілази [КФ: 3.5.1.18], діамінопімелатна

епімерази [КФ: 5.1.1.7], діамінопімелат-декарбоксилази [КФ: 4.1.1.20], відповідно. Кінцевою стадією перетворення є утворення ϵ -ПЛ з лізину за допомогою полімеризації яка відбувається в ϵ -позиції.

Схематичне зображення біотрансформації глюкози в ϵ -полілізин у *Streptomyces albulus* наведено в додатку 1.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

5.1.1.1. Обґрунтування способу культивування

S. albulus LS-84 – представник роду *Streptomyces*, який може бути використаний як потенціальний продуцент ϵ -полілізину для промислових цілей. Даний мікроорганізм є мезофільним ацидофілом, оскільки оптимальна температура культивування є 30 °С, а рН 3,8. На початку культивування рН перебуває на рівні 6,8, але вже через 20 год культивування рН знижується до позначки 3,8. Хоча умови вирощування даного продуцента є несприятливими для більшості контамінуючої мікрофлори, проте для усунення можливої контамінації процес культивування пропонується проводити в асептичних умовах.

Незважаючи на те що, ϵ -полілізін є полі-амінокислотою, ϵ -ПЛ є вторинним метаболітом, що накопичується в середовищі культивування у стаціонарній фазі росту продуцента, тому для вирощування даного мікроорганізму доцільним є застосування глибинного культивування у періодичному режимі.

S. albulus LS-84 є облигатним аеробом, тому ферментація проходить в умовах безперервної подачі стерильного повітря через барботер до ферментатора.

Зазначимо, що для утворення у високих концентраціях зазначеної полі-амінокислоти в умовах виробничого біосинтезу *S. albulus* LS-84 необхідним є внесення підживлюючого розчину.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобко О.В.					37	124
Перевір.		Скроцька О.І.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

Отже, для культивування *S. albulus* LS-84 з метою отримання високої концентрації ϵ -полілізину було обрано періодичне культивування глибинним способом при безперервній аерації в асептичних умовах з підживленням.

5.1.1.2. Обґрунтування вибору ферментера

При виборі ферментера враховують морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні особливості штаму продуцента, а також економічні аспекти потреби продукції.

Визначивши що синтез ϵ -ПЛ відбувається в аеробних умовах, то важливе значення для аеробного процесу має система аерації, необхідним є встановлення барботера, який забезпечить безперервну подачу стерильного повітря, а додаткове перемішування підвищить ефективність масообмінних процесів, що позитивно вплине на показники ефективності культивування продуцента. Барботер встановлюється під мішалкою, яка створює вихрові рухи і тим самим розподіляє аераційне повітря рівномірно у товщі середовища.

Оптимальною температурою культивування є 30 °C, для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

В поживному середовищі є кукурудзяний глютен, який виступає піноутворюючим компонентом, для запобігання можливого утворення піни буде використовуватися хімічний спосіб піногасіння.

Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

Зважаючи на те, що раніше ми вибрали культивування з підживленням, то необхідним є встановлення датчика для підтримання сталої концентрації джерела вуглецю.

Отже, вибір ферментаційного обладнання, для виробничого біосинтезу, залежить від вимог, встановлених для культивування обраного біологічного агенту.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Streptomyces albulus LS-84 вирощується в аеробних умовах, тому необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися в окремих будівлях (компресорних відділеннях), оскільки витрати повітря будуть великі.

Стадії підготовки аераційного повітря:

- Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці $H \sim 20$ м (висота поверху – 7 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 14 м, разом з косим дахом будівлі (+3 м) – 17, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °C парою у відповідних теплообмінниках;
- очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, установлених поблизу ферментаційних відділень, ступінь очищення $E=95\%$;
- очищення в індивідуальних фільтрах (ступінь очистки $E=99,99\%$), установлених на ферментері, повітря до яких подається

безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи (колектори).

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Обґрунтування вибору мийного засобу для оброблювальних об'єктів.

В процесі біотехнологічного виробництва важливим етапом є передбачення процесу миття обладнання, комунікацій та тари, зважаючи на основні вимоги за якими вибирають мийчі засоби, а саме: мийча здатність та ціна розглянемо декілька наступних варіантів.

Біомой – діюча речовина алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0% -8,0%, лужна протеаза (Ензим). Використовується для миття та дезінфекція різноманітного технологічного обладнання, інвентарю, комунікацій і тари (особливо відмінно мие склотару) на підприємствах харчової та молочної промисловості, на підприємствах з виробництва пива, алкогольних і безалкогольних напоїв. Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 15 г/дм³); робочі розчини біомою безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і мають виражені емульгуючі і мийчі властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях.

Каустична сода (їдкий натрій - NaOH) – ефективна для миття жирних поверхнь, для миття білкових залишків, залишків солей чи мікроорганізмів, та продуктів їх життєдіяльності. Недоліком є те, що каустична сода є шкідливою для людини (2 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Тому ми не рекомендуємо використовувати дану речовину для миття обладнання, щоб уникнути нещасних випадків [27].

Кальцинована сода – має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Вона є більш безпечною для використання (3 клас небезпеки – помірно небезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007). Саме тому,

ми її обираємо у якості миючого засобу для ферментаційного обладнання. Також, це є більш економічно вигідний варіант [27].

Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для оброблювальних об'єктів.

Ще одним важливим етапом виробництва препаратів які будуть використовуватись в якості харчової добавки це вибір дезінфікуючого засобу. Під час вибору варто врахувати що необхідно застосовувати дезінфікуючі засоби з інтервалом в 2 тижні для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Виробництво триває 320 трудоднів, отже необхідно підібрати 2 різних миючих засобів для оброблення поверхонь. Розглянемо декілька дезінфікуючих засобів.

«ITS WATER DEZ-330» – лужний дезінфікуючий засіб на основі гіпохлориту містить концентрацію 11,0-15,0% гіпохлориту натрію. Використовується для дезінфекції приміщень (стіни, підлоги тощо), технологічного обладнання, трубопроводів, тари та інших об'єктів на підприємствах. Переваги даного засобу містить стабілізатор активного хлору, виявляє широкий спектр дезінфікуючих властивостей, легко змивається.

«КОВІЦИД ФОРТЕ» – діюча речовина перекис водню 12,5%, молочна кислота 12,5%, має бактерицидні властивості відносно широкого спектру мікроорганізмів, являє собою концентрований розчин для дезінфекції та очищення поверхонь, обладнання, апаратури, меблів, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю. Повністю біорозчинний. Суміш перекису водню і молочної кислоти забезпечує виражену активність дезінфектанту.

«Перекис водню» – відноситься до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Подразнює шкіру, слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Тому, ми не рекомендуємо його використовувати як дезінфікуючий засіб, адже він не відповідає вимогам [27].

Як дезінфікуючі засоби обираємо «ITS WATER DEZ-330» і «КОВІЦИД ФОРТЕ».

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез ϵ -полілізину (32,6 г/л за 196 год) досягається за умов росту гібридного штаму *Streptomyces albulus* LS-84 на середовищі наступного складу, г/л:

- Глюкоза – 52;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10;
- Кукурудзяний глютен – 20;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;
- K_2HPO_4 – 0,8;
- KH_2PO_4 – 1,36;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04.

У процесі культивування, починаючи з 40 год, через кожні 20 год здійснюється дробне внесення глюкози і $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до кінцевої концентрації 360 г/л і 11 г/л відповідно.

Відповідно до розрахунків, наведених в розділі 3, виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 10 м³, що містить 4 931,4 м³ поживного середовища. Інокулянт отримують у чотири етапи: у колбах на качалках та в інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л і 1 м³.

Поживне середовище для вирощування посівного матеріалу містить 5 г/л дріжджового автолізату, а під час виробничого біосинтезу в якості джерела азоту використовують 20 г/л кукурудзяного глютену.

5.1.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокулянту в колбах на качалках

Для вирощування початкового посівного матеріалу використовують середовище з наступним складом, г/л:

- Глюкоза – 52;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10;
- Дріжджовий автолізат – 5;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;

- K_2HPO_4 – 0,8;
- KH_2PO_4 – 1,36;
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,03;
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,04.

Стерилізація буде відбуватися в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища (0,54 л), проаналізувавши вище наведене поживне середовище ділимо його на наступні композиції, в залежності від режиму стерилізації окремих його складових:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112 °С, 20 хв);

Композиція В: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв);

Композиція С: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв);

Розчин глюкози і дріжджового автолізату (композиція А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція С) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

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

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л.

На даній стадії підготовки посівного матеріалу необхідно приготувати 5,4 л поживного середовища, тому ділимо його на наступні композиції, в залежності від режиму стерилізації окремих його складових:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112 °С, 20 хв);

Композиція В: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв);

Композиція С: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв);

Розчин глюкози та дріжджового автолізат (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві, у колбі об'ємом 2 л за наступних режимів: 112°C, 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція С) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л.

Для цієї стадії необхідно приготувати 53,42 л поживного середовища, поділ композицій відбувається як і для 10 л інокулятора. Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію В готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в інокулятор перистальтичним насосом подають композицію А і доводять рН до 6,8 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³.

Для посівного апарата 1 м³ необхідно 528,91 л поживного середовища, поділ композицій відбувається як і для 100 л посівного апарата.

Композиція А: глюкоза, дріжджовий автолізат (режим стерилізації: 112 °С, 20 хв);

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв);

Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію В готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в інокулятор перистальтичним насосом додають композицію А і доводять рН до 6,8 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

5.1.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно приготувати 1 204,28 л поживного середовища.

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний глютен (режим стерилізації: 112 °С, 20 хв);

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв);

Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі, спочатку вносять і заварюють кукурудзяний глютен, а потім до нього додають глюкозу. Композицію В готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

Виробничий біосинтез відбувається з дробним внесенням розчину глюкози та амоній сульфату, тому підживлювальні розчини глюкози та амоній сульфату готується та стерилізується в окремих реакторах-змішувачах.

Підживлювальний розчин глюкози готують в реакторі об'ємом 5 м³ (1 612,7 кг глюкози і 4 031,7 л води). Готовий розчин стерилізують в реакторі при 112°С упродовж 30 хв. Після стерилізації, починаючи з 40 години, підживлюючий розчин кожні 20 год перистальтичним насосом подається в ферментер об'ємом 10 м³.

Підживлювальний розчин амоній сульфату готують в реакторі об'ємом 100 л (49,744 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і 80 л води). Готовий розчин стерилізують в реакторі при 131°С упродовж 40 хв. Внесення розчину в ферментер об'ємом 10 м³ відбувається автоматично, за допомогою перистальтичного насосу.

5.1.4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для приготування поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно простерилізувати композиції з яких буде складатися ПС. Для

унеможливлення випадіння осадів фосфорних солей Магнію, Феруму та Мангану, під час нагрівання розчину солей в апараті, необхідно перед стерилізацією внести 6 %-ий розчин хлоридної кислоти і враховуючи що оптимальним рН для накопичення біомаси у *S. albulus* LS-84 знаходиться на рівні 6,8, необхідно перед внесенням посівного матеріалу підлужити поживне середовище за допомогою 6 %-го розчину NaOH.

Під час виробничого біосинтезу рівень рН знижується нижче позначки 3,8. Проте оптимальним для синтезу більшої кількості ϵ -ПЛ є рН 3,8, а відхилення від оптимального рівня рН впливає на ріст і синтезувальну активність ϵ -ПЛ, тому необхідно автоматично додавати 25 %-ий розчину $\text{NH}_3 \times \text{H}_2\text{O}$.

Поживне середовище на виробничий біосинтез містить піноутворюючий компонент, а саме кукурудзяний глютен, який є відходом при виробництві кукурудзяного крохмалю. Також під час культивування відбувається інтенсивна аерація, тому необхідно використати механічний або хімічний метод піногасіння. В якості хімічного способу можна використати піногасник 204 [28], який вноситься в поживне середовище з концентрацією від 0,005 до 0,01 %. В якості механічного способу встановлюємо у верхній частині ферментера мішалку, яка усуває піну в результаті зрізових зусиль.

Отже технологічна схема окрім стадій підготовки посівного матеріалу, включає такі додаткові стадії:

- 1) підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- 2) приготування 6% розчину HCl, для підкислення середовища при стерилізації його в посівному апараті об'ємом 100 л, 1 м³ та 10 м³;
- 3) приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівному апараті об'ємом 100 л, 1 м³ та 10 м³;
- 4) приготування та стерилізація підживлювальних розчинів глюкози та амоній сульфату для виробничого біосинтезу;
- 5) приготування піногасника для запобігання піноутворення під час виробничого біосинтезу;

- б) заварювання кукурудзяного глютену, перед стерилізацією в установці безперервної стерилізації.

Таблиця 5.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування розчинів та стабілізації рН середовища

Об'єм середовища, л	NaOH (6%)		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,51	-	-	-	-
5,07	-	-	-	-
50,32	100,6	у колбі на 250 мл	100,6	у колбі на 250 мл
498,12	996,3	у колбі на 2 л	996,3	у колбі на 2 л
1 204,28	2 408,6	у реакторі 5 л	2 408,6	у реакторі 5 л

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Оскільки ϵ -полілізин є екзометаболітом то першим етапом виділення та очищення поліамінокислоти є відділення від біомаси. Сьогодні є кілька технологій при використанні яких можна отримати ϵ -полілізин, отже розглянемо їх.

Згідно першого методу який описується в патенті [29] виділення та очищення відбувається за наступним принципом:

- Початковим етапом є розведення культуральної рідини за допомогою водопровідної води та в подальшому фільтрування або центрифугування для відділення біомаси і отримання прозорого супернатанту;
- Потім використовується ультрафільтраційна мембранна система, для видалення водорозчинних високомолекулярних домішок, з відсіканням молекулярної маси вище 1000 кДа, які знаходять у супернатанті, в подальшому пермеат ультрафільтрації надходить у первинну іонообмінну колону для адсорбції ϵ -полілізину на слабокислій катіонообмінній смолі амберліт IRC-50, для видалення речовин які залишились на поверхні смоли та не вступили з нею в реакцію смолу промивають деіонізованою водою, а для десорбції ϵ -полілізину використовують 1 М розчин хлоридної кислоти; елюат збирають з

первинної іонообмінної колони і в подальшому подаються у вторинну іонообмінну колону;

- Отримана рідина після вторинної іонообмінної колони надходить на ультрафільтраційну установку, яка використовується для концентрування рідини та відсікання речовин з молекулярною масою вище 100 кДа;
- В процесі адсорбції ϵ -полілізину на слабокислій смолі відбувається забарвлення розчину, для отримання знебарвленої рідини її нагрівають до 80 °С додають приблизно 1% (мас./Об.) активованого вугілля, та перемішують протягом 20 хв ;
- Знебарвлена рідина, отримана на попередній стадії надходить на вакуум випарну установку (температура не повинна перевищувати 60 °С) де концентрується до вмісту ϵ -полілізину 10-30%;
- Отриманий концентрат, сушать за допомогою розпилювальної сушарки, отримуючи ϵ -полілізин.

В результаті даного методу отримується ϵ -полілізин з чистотою 95,2%, так як потреба на даний продукт розглядалась в харчовій промисловості, висока ступінь очищення не є необхідною умовою тому через неефективні економічні витрати на процес очищення, а саме необхідність встановлення більшого за геометричним розміром реактора для розведення культуральної рідини перед відділенням біомаси та можливе використання центрифуги, яка має великі габарити та високі витрати енергії на привід, використання даного методу є недоцільним.

В статі [30] описано наступну методику очищення ϵ -полілізину, схематичне зображення наведено на рис 5.1.

Дана методика є найоптимальнішою через відсутність недоцільних витрат на процес очищення, кількісне значення втрат продукту за весь період очищення становить 25%, що є найкращим результатом, та чистота отриманого продукту приблизно 90,2%, що задовольняє ступінь очищення для харчового консерванту.

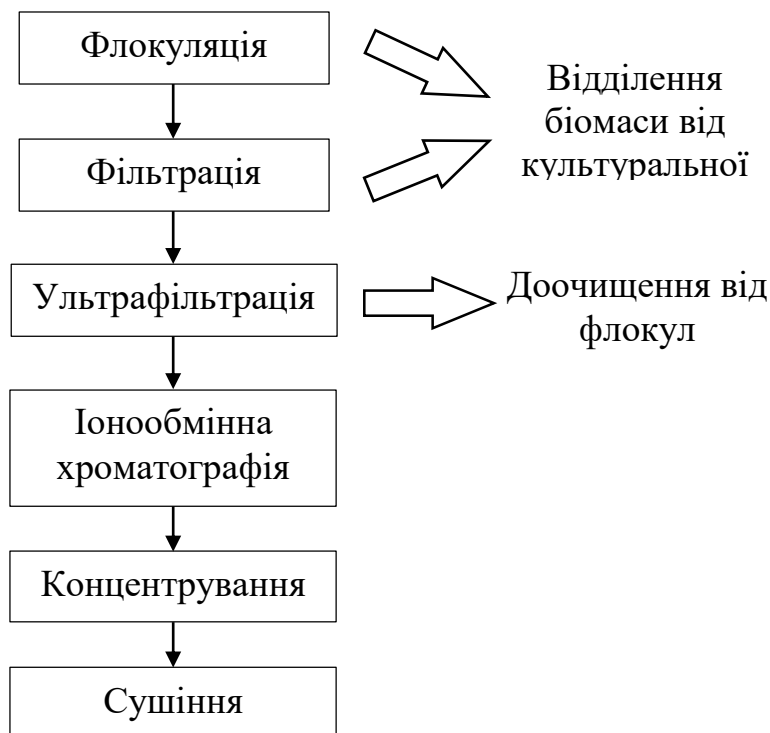


Рис 5.1. Схематичне зображення виділення та очищення ϵ -полілізину.

Отже, процес виділення та очищення поліамінокислоти можна умовно поділити на декілька етапів, а саме:

1. Відділення біомаси від культуральної рідини;
2. Доочищення фільтрату;
3. Виділення ϵ -полілізину;
4. Концентрування;
5. Сушіння.

5.2.1. Обґрунтування методу виділення біомаси від культуральної рідини.

В результаті виробничого біосинтезу ϵ -полілізину ми отримуємо культуральну рідину об'ємом 5,184 м³, з вмістом сухої біомаси 41,2 г/л. З кількості сухої біомаси та зважаючи на те що синтез ϵ -ПЛ відбувається за допомогою стрептоміцета, можна припустити, що культуральна рідина буде густою. Також зважаючи на те що ϵ -полілізін є екзометаболітом, тобто він знаходиться поза клітиною мікроорганізму, першим етапом очищення є виділення біомаси.

Найпоширенішими способами відділення біомаси є: фільтрування, центрифугування та сепарування [31], переваги та недоліки даних методів наведено в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Порівняльна характеристика методів відділення біомаси

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Відділення біомаси	Фільтрування	можливість застосування конструкцій фільтрів з розвиненою фільтрувальною поверхнею; можливість промивання та віджиму осаду; ефективність процесу менше залежить від концентрації біомаси в культуральній рідині а також в'язкості останньої [31].	зменшення швидкості процесу внаслідок накопичення осаду на фільтрувальній перегородці; необхідність попередньої обробки культуральної рідини. [31]
	Центрифугування	висока продуктивністю процесу; компактність обладнання; відсутність допоміжного обладнання; широкі можливості механізації та автоматизації процесу [31].	складність конструкції; високі вимоги до точності виготовлення вузлів; високі витрати енергії на привід; висока вартість [31].
	Сепарування	невеликі втрати активної речовини; відсутність необхідності застосування фільтрувальних добавок; можливість автоматизації; компактність обладнання; ефективне для відділення великих за розмірами клітин [31].	великі витрати енергії; не підходить для високов'язких рідин [31].

Розглянемо більш детально дані методи, і визначимо який з них є найбільш економічно вигідним. Зважаючи на те що в нас культуральна рідина буде густою, одразу можна зробити висновок що сепарування для відділення біомаси не підходить. Також одразу можна виключити метод центрифугування, через те що ϵ -ПЛ є екзометаболітом використання даного методу для відділення біомаси не є економічно вигідним (необхідно тільки відділити біомасу, руйнування клітин не потрібне отже центрифуга використовується не повною мірою).

Фільтрування є основним способом відділення біомаси від культуральних рідин. Зважаючи на те що біологічним агентом виступає *S. albulus LS-84* в процесі культивування будуть утворюватися добре розвинені вегетативні гіфи [11]. Розглянувши морфологічні ознаки та зважаючи на те що культуральна рідина буде густою перед фільтрування необхідно провести попередню обробку КР, найчастіше використовують розведення за допомогою додавання води та флокуляцію.

Розглянемо фільтрування з попереднім розведенням культуральної рідини за допомогою внесення великої кількості води, та з використанням фільтрувальних перегородок з діаметром пор 1 мкм. Як зазначається в патенті [29], для кращого фільтрування необхідно додавати до культуральної рідини воду в чотирикратному або восьмикратному об'ємі, що в свою чергу передбачає додаткові витрати на встановлення збірника набагато більших об'ємів (об'єм культуральної рідини 5,184 м³, в найкращому випадку необхідно додати 20,7 м³ води питної, отже, це призведе до необхідності встановлення після виробничого біосинтезу збірника культуральної рідини об'ємом приблизно 30 м³).

Флокуляція це фізико-хімічний процес злипання дрібних частинок дисперсних систем в більш великі частинки під впливом сил зчеплення з утворенням коагуляційних структур, даний процес відбувається за допомогою внесення флокулянтів з плавним перемішуванням. Частинки дисперсної фази є великі пухкі пухирці – флокули [32], здатні до швидкого осідання або спливання [33]. В якості флокулянтів часто застосовують синтетичні полімерні матеріали, зокрема поліакриламід. З неорганічних флокулянтів активно застосовують силікатну кислоту [34]. Використовуючи флокуляцію як метод попередньої обробки культуральної рідини ми отримаємо згущену суспензію та освітлену рідину.

Проаналізувавши описані вище методи відділення біомаси, можемо дійти до висновку, що найоптимальнішим варіантом буде використання комбінованого методу, який складається з попередньої обробки культуральної рідини за допомогою внесення флокулянта та наступної фільтрації, оскільки

при використанні флокуляції ми зможемо позбутися неефективних економічних витрат на розведення КР за допомогою великої кількості води, дане рішення є більш доцільним.

Для обрання флокулюючого агента, проведемо порівняння флокулянтів які на сьогоднішній день використовуються для агломерації клітин *Streptomyces* в культуральній рідині. В таблиці 5.3 наведена порівняльна характеристика флокулянтів.

Таблиця 5.3

Порівняльна характеристика флокулянтів

Флокулянт	Мікроорганізм	Кінцева концентрація	Оптимальний рівень рН	Література
Поліакрилат натрію	<i>Streptomyces albulus</i> M-Z18	800 мг/л	1,5	[30]
Поліхлорид алюмінію + NH ₄ Cl	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	13,5 мл/л + 1,2 г/л	6,0	[35]

Як зазначалось раніше ми отримуємо 5,184 м³ культуральної рідини, розглянувши дані наведені в таблиці 5.3, можна дійти висновку що найкращим флокулянтом є поліакрилат натрію, через найменшу кількість при якій утворюються флокули, а саме 4,15 кг, в той час як поліхлориду алюмінію з хлоридом амонію, який слугує електролітом для підсилення дії флокулянту, необхідно 69,9 л + 6,2 кг. Зазначимо що кількістю кислоти і лугу, які використовуються для отримання оптимального рівня рН в порівнянні можна знехтувати, так як початковий рівень рН культуральної рідини після виробничого біосинтезу становить 3,8, що при розрахунках не сильно впливає на результат.

Підсумовуючи вище наведену інформацію, процес відділення біомаси від культуральної рідини буде відбуватись наступним чином.

До культуральної рідини додають 27,43 л 6 М HCl для пониження рівня рН до 1,5 (зниження до даного рівня призводить до катіонізації більшості білків, що в свою чергу призводить до легшої взаємодії з флокулянтом за допомогою електростатичного притягання) і при постійному перемішуванні (спочатку 200 об/хв, впродовж 2 хв, потім 75 об/хв, впродовж 3 хв) додають

4,15 кг натрій поліакрилату (дана кількість відповідає оптимальній кінцевій концентрації 800 мг/л, при меншій або більшій концентрації флокулянта в культуральній рідині швидкість фільтрування зменшується). Отриманий розчин перекачують на фільтраційну установку [30]. В якості фільтраційної установки доцільніше буде використовувати мембранний або камерний фільтр-прес, через великий об'єм культуральної рідини який необхідно профільтрувати (використання нутч-фільтра або друк-фільтра є недоцільним через великий об'єм КР та об'ємної частки осаду).

5.2.2. Доочищення фільтрату

Доочищення фільтрату від флокул які пройшли крізь пори фільтр-пресу, можна досягти за допомогою використання баромембранних процесів: мікрофільтрації або ультрафільтрації [31], переваги та недоліки даних методів наведено в таблиці 5.4. Обидва ці процеси передбачають пропускання оброблюваної рідини через пористі напівпроникні мембрани. Відмінність полягає лише в розмірі пор мембран: 0,1-10 мкм в мікрофільтрації, 0,01-0,1 мкм в ультрафільтрації. Інакше кажучи, мікрофільтрацією можна досягти лише відділення флокул, а при ультрафільтрації – ще й вилучити розчинені макромолекули.

Таблиця 5.4

Порівняльна характеристика методів доочищення фільтрату

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Доочищення фільтрату	Мікрофільтрація	вища швидкість процесу	неможливість вилучення розчинених макромолекул
	Ультрафільтрація	можна вилучити розчинені макромолекули	нижча швидкість процесу

Отже, для очищення фільтрату з попередньої стадії від деяких розчинних речовин та флокул які пройшли крізь мембрану фільтр-пресу використовують ультрафільтрацію при 0,1 – 0,15 МПа на вході. Так як ультрафільтраційна система використовується для концентрування та очищення від високомолекулярних розчинених речовин, зв'язок між клітинами, який утворює флокули, необхідно зруйнувати та провести процес

з відсіканням молекулярної маси 5 кДа (зважаючи на максимальну молекулярну масу ϵ -ПЛ 4 700 г/моль). Як зазначалось вище для легшого агломерування клітин на стадії флокуляції необхідно зменшити рівень рН, отже при збільшенні рівня рН зв'язок між клітинами за допомогою якого формуються флокули буде руйнуватись. Тому перед ультрафільтрацією необхідно збільшити рівень рН до 6,5 за допомогою внесення 39,1 л 6 М NaOH.

В якості фільтраційної системи доцільно використати ультрафільтраційну установку серії ТСВ-УФС виготовленої на замовлення в ГК «Вагонмаш» з продуктивністю 5 м³/год та встановленням фільтрувальних касет придбаних в «Sartorius» з відсіканням молекулярної ваги в 5 кДа [36]. Так як після фільтрації ми отримуємо приблизно 3,65 м³, процес ультрафільтрації займе не більше години [37].

5.2.4. Виділення ϵ -полілізину

Після доочищення фільтрату необхідно виділити ϵ -полілізин, цього можна досягти за допомогою використання іонообмінної колони.

Зважаючи на хімічну структуру ϵ -полілізину, найкращим варіантом іонообмінної смоли для видалення ϵ -полілізину буде катіонний тип. Даний тип смоли має наступний принцип дії: в карбоксильній групі іонообмінної смоли знаходиться сполука (при заміщенні катіон, найчастіше H⁺), яка заміщується при взаємодії з розчином на іони подібного заряду.

В статі [38] проводиться визначення найкращої катіонообмінної смоли для виділення ϵ -полілізину. В результаті експериментів найкращі показники проявляють дві смоли амберліт IRC-50 та HZD-3В. Порівнюючи дані смоли, найкращою буде амберліт IRC-50, так як рівень адсорбції знаходиться майже на однаковому рівні, перевагою даної смоли є найвищий показник десорбції 96%, що на 70 % більше ніж у HZD-3В.

Амберліт IRC-50 це слабокислий, полікарбоневий кислотний тип катіонообмінної смоли, який застосовується для фракціонування білків та має іонну форму H⁺ [39]. Для обрання елюента необхідно враховувати іонну форму смоли, елюентом може слугувати в невеликих концентраціях розчини NaOH,

HCl, $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Зважаючи на іонну форму даного амберліту в пріоритеті він буде приєднувати H^+ тобто в якості елюента буде виступати HCl. Для використання інших елюючих розчинів попередньо необхідно замінити іонну форму, даний процес відбувається за допомогою промивки смоли наступним методом: щоб замінити іонну форму з H^+ на Na^+ необхідно промити її в наступному порядку 6 М NaOH – 6 М HCl – 6 М NaOH, такий же самий принцип і для $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Так як зміна елюючого розчину призводить до невеликого збільшення рівня десорбції ϵ -полілізину (на декілька відсотків) процес зміни іонної форми не є доцільним через необхідність затрати додаткових коштів на приготування промивних розчинів.

Використовуючи HCl в якості елюенту необхідно використовувати розчини з низькою концентрацією, так як при збільшенні концентрації HCl буде відбуватись небажане випадання солей що призведе до більших затрат на стадії концентрування. Оптимальним рівнем концентрації є 0,25 М HCl [30].

Також зважаючи на константу дисоціації карбоксильної групи в смолі, яка дорівнює 3,9, перед адсорбцією необхідно підвищити рівень рН до 8,5 (ізоелектрична точка ϵ -полілізину 9,0 при вищому рівні рН він буде змінювати свою полярність), що дозволить збільшити рівень дисоціації карбоксильної групи і призведе до кращої адсорбції ϵ -полілізину.

Отже етап виділення буде відбуватися наступним чином:

Фільтрат ультрафільтрації доводять до рН 8,5 за допомогою 6 М NaOH. Згодом фільтрат завантажують до колони, заповненої амберліту IRC-50. Після завантаження використовують деіонізовану воду для промивання смоли і для елюювання ϵ -ПЛ з смоли використовують 0,25 М HCl.

Після десорбції ϵ -полілізину з пермеату ми отримуємо забарвлений розчин, який перед концентруванням та сушінням необхідно знебарвити. Пігменти в розчині зазвичай з'являються від компонентів поживного середовища, реакції Маяра (при взаємодії амінокислот з редукуючими цукрами під впливом температури утворюються забарвлені сполуки – меланоїдини) та в наслідок життєдіяльності мікроорганізмів. Одним із компонентів поживного середовища є кукурудзяний глютен, який має жовте

забарвлення і в процесі культивування в культуральній рідині будуть знаходитись жовті пігменти. На сьогоднішній день найчастіше для знебарвлення розчинів використовують макропористі смоли та активоване вугілля [40]. Для порівняння візьмемо макропористі смоли SX-8, DA201-D та активоване вугілля.

В статті [40] експериментальним шляхом було визначено оптимальні умови при яких рівень адсорбції пігменту є найвищим, а втрати ϵ -полілізину найменшими, а саме рівень рН, температуру та швидкість подачі розчину, для процесу знебарвлення за допомогою макропористих смол та активованого вугілля. Оптимальні умови наведені в таблиці 5.5.

Таблиця 5.5

Оптимальні умови процесу знебарвлення для макропористих смол та активованого вугілля.

	рівень рН	Температура, °С	Швидкість подачі розчину, (1 л розчину на 1 л смоли за годину)
Макропориста смола SX-8	7,0	30	1,0
Макропориста смола DA201-D	6,0	30	1,0
Активоване вугілля (AB)	4,0	80	1 г AB на 100 мл розчину

Також для більш точного порівняння розглянемо фізичні властивості даних смол, які наведені в таблиці 5.6.

Таблиця 5.6

Фізичні властивості макропористих смол

Макропориста смола	Питома площа поверхні, м ² /г	Середній розмір пор, нм
SX-8	100-120	28-30
DA201-D	600-800	5-7

Процес адсорбції пігменту на макропористих смолах буде відбуватись наступним чином, елюат пропускають через смолу і при проходженні розчину пігмент буде затримуватись в порах смоли. Даний процес відбувається за рахунок можливості смол пропускати і адсорбувати молекули тільки певного розміру, що не перевищують розміри пір даних смол.

Розглянувши дані наведені в статі [41], а саме що розмір дрібних частинок жовтого пігменту не перевищує 40 нм, теоретично можна дійти висновку що найкращі адсорбційні властивості має проявляти макропориста смола SX–8, через діаметр пор 30 нм.

За своїми адсорбційними властивостями в статі [40] було практично порівняно макропористу смолу SX-8 та активоване вугілля, в результаті активоване вугілля має показники знебарвлення та втрат ϵ -полілізину приблизно 78% та 10%, відповідно, а макропориста смола проявляє адсорбційні властивості пігменту на рівні 83,9% з втратами ϵ -полілізину 2,7%.

Провівши порівняння в вигляді адсорбційних можливостей розглянемо який з вище наведених варіантів знебарвлення є найбільш економічно вигідним. Після процесу десорбції ми отримуємо 8 618 л елюату, для зручності розрахунків візьмемо приблизне значення 8,6 м³. Так як нам необхідно знебарвити 8,6 м³ розчину, за оптимальних умов нам необхідно буде 1,73 м³ макропористої смоли SX–8 і процес знебарвлення буде відбуватись 5 годин. На дану кількість елюату необхідно буде додати до нього 86 кг активованого вугілля та підтримувати температуру на рівні 80 °C впродовж 30 хв, що в свою чергу призведе до великих теплових втрат. Також після проведення процесу адсорбції пігменту за допомогою активованого вугілля знебарвлений розчин необхідно буде профільтрувати що б позбутись від АВ, який в подальшому піде на регенерацію.

Отже найкращим варіантом знебарвлення елюату є використання макропористої смоли SX–8, незважаючи на велику кількість необхідної смоли в порівнянні з активованим вугіллям, вона легше регенерується і є безпечнішою для довкілля, а також через менші економічні витрати на підігрів розчину в порівнянні з активованим вугіллям (оптимальна температура елюату при використанні смоли 30 °C, а при використанні активованого вугілля 80 °C), відсутність допоміжних робіт (при знебарвленні активованим вугіллям розчин необхідно попередньо профільтрувати перед використанням в наступному етапі) та менший рівень втрат ϵ -полілізину (2,7%).

5.2.5. Концентрування

В технічній та науковій літературі не наведено властивості ϵ -полілізину по відношенню до температури, тобто при якій температурі він втрачає свої властивості, але зважаючи на інформацію з статі [42] в якій наводиться те що ϵ -ПЛ не деградує та не втрачає довжину полімеру при кип'ятінні розчину за температури 100 °C протягом 30 хв та при автоклавованні за умов 120 °C протягом 20 хв, можна дійти до висновку що він є термолабільною речовиною.

Концентрування розчинів можна здійснювати за допомогою випарювання або ультрафільтрації [31]. Порівняльна характеристика методів концентрування наведена в таблиці 5.7.

Таблиця 5.7

Порівняльна характеристика методів концентрування

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Концентрування	Випарювання	високий ступінь випарювання; низька металоємність конструкції; високий енергетичний потенціал вторинної пари; малий час перебування вихідного продукту в апараті за вертикального компонування [31].	можлива часткова інактивація ϵ -полілізину внаслідок нагрівання; потреба в надійній системі підтримки вакууму; значні витрати води на конденсацію водяної пари; чималі витрати енергії [31].
	Ультрафільтрація	одночасно з концентруванням відбувається також і очищення від низькомолекулярних домішок; компактність і герметичність обладнання; відсутність термічного впливу на продукт [31].	зниження швидкості процесу через явище концентраційної поляризації; необхідність періодичної заміни мембрани; висока вартість обладнання [31].

Оскільки ϵ -полілізин є термолабільною речовиною, серед методів випарювання доцільно розглянути лише вакуум-випарювання. Після знебарвлення елюату враховуючи втрати, ми отримуємо 8,22 м³ розчину який необхідно випарити. Враховуючи максимальну температуру яку ми можемо використовувати при випарюванні і кількості початкового розчину даний метод передбачає велику кількість теплових втрат. Для зменшення неефективних економічних втрат процес концентрування краще проводити на

ультрафільтраційній установці, також враховуючи можливість під час концентрування очищення від низькомолекулярних домішок, а саме від розчину 0,25 М HCl, який використовувався для елюювання ε-ПЛ в надлишкових кількостях, ультрафільтрування можна провести з відсіканням молекулярної маси 1 кДа, даний варіант є найоптимальнішим.

В якості ультрафільтраційної установки доцільно використати ультрафільтраційну установку серії ТСВ-УФС виготовленої на замовлення в ГК «Вагонмаш» з продуктивністю 10 м³/год та встановленням фільтрувальних касет придбаних в «Sartorius» з відсіканням молекулярної ваги в 1 кДа [36]. Так як після знебарвлення ми отримуємо приблизно 8,22 м³, процес ультрафільтрації займе не більше години [37].

5.2.6. Сушіння

Після концентрування розчину останньою стадією виділення ε-полілізину є сушіння, приймаючи до уваги, що ε-ПЛ не втрачає своїх властивостей при температурі 120 °С впродовж 20 хв, для отримання порошкоподібного продукту можна використовувати сублімаційне сушіння або розпилювальну сушарку не перевищуючи температуру 120 °С. Порівняльна характеристика даних методів сушіння наведена в таблиці 5.8.

Таблиця 5.8

Порівняльна характеристика методів сушіння

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Сушіння	Розпилювальне	висока швидкість сушіння; не потребують точного забезпечення та витримки потоку теплоносія; температура теплоносія відносно невисока [31].	необхідність встановлення циклонів для очищення відпрацьованого повітря від частинок твердої фази; вибухонебезпечність [31].
	Сублімаційне	збереження молекулярної структури та об'єму висушеного матеріалу; хороша дисперсність і	за витратами енергії практично рівноцінні сушінню за атмосферного тиску, але при цьому витрати на побудову

		пористість висушеного матеріалу [31].	сушарки значно вищі [31].
--	--	---	------------------------------

Розглянувши данні з таблиці 5.8, та беручи до уваги що після концентрування ми отримуємо 1,48 м³ розчину та зважаючи що процес підготовки повітря відбувається перед виробничим біосинтезом, тобто не потрібно повторне встановлення апаратів для забору та нагрівання повітря, оптимальним варіантом буде використання розпилювальної сушарки через наступні фактори: на процес сушіння буде затрачено менше часу в порівнянні з сублімаційним методом; не потрібна попередня підготовка захисних розчинів; після сушіння ми отримуємо вже готовий порошкоподібний продукт, при сублімаційному необхідне встановлення дробарки після сушіння.

Отже процес сушіння буде відбуватись в розпилювальній сушарці з температурою сушильного агента не вище 120 °С, отриманий порошкоподібний продукт подають і зберігають в пересувних ємностях об'ємом 200 кг.

5.2.7. Пакування та маркування.

Заключною стадією виділення та очищення ϵ -ПЛ є його пакування та маркування. Після процесу сушіння ми отримуємо порошкоподібний ϵ -полілізин, так як зберігати його можна при кімнатних температурах та зважаючи на відсутність інформація про те що він втрачає свої властивості при контакті з сонячними променями оптимальним варіантом в якості тари для пакування буде поліетиленові пакети, через невелику вартість, зручність експлуатування, гарний захист від вологи та можливість нанесення маркувальних знаків. Так як після процесу сушіння ми отримуємо 122 кг порошку і беручи до уваги що в якості харчового консерванту ϵ -полілізин необхідно вносити в малих об'ємах, доцільно фасувати продукт в пакети по 100 г.

В якості фасувально-пакувальної машини перевагу надаємо апарату «ПИТПАК» з продуктивність 45 упаковок/хв та максимальним об'ємом пакування – 2 кг [43].

Після фасування на готовий продукт наносять маркування, вказують назву товару, дату виготовлення, номер серії та термін придатності, поліетиленові пакети поміщають в картонні коробки, які складають на палети і направляють на склад.

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту

В процесі виділення та очищення ϵ -полілізину на стадіях відділення від біомаси, доочищення та іонообмінне виділення для зменшення втрат та покращення показників виділення необхідною умовою є доведення показників рН до оптимальних. Зважаючи на те що концентрації титрувальних агентів не впливає на кінцеві показники чистої продукції для зменшення геометричних об'ємів реакторів, в яких дані розчини будуть готуватись, можна використовувати вищу концентрацію ніж ми використовуємо в період виробничого синтезу. Зважаючи на метод виділення ϵ -полілізину, а саме використання катіонообмінної смоли, для процесу десорбції передбачається попереднє приготування 0,25 М розчин HCl, при збільшені концентрації елюенту відбувається небажане збільшення навантаження на процес концентрування.

Отже процес виділення та очищення повинен передбачати допоміжні роботи у вигляді приготування титрувальних агентів, а саме:

- приготування 6 М розчину HCl (для підкислення перед флокуляцією);
- приготування 0,25 М розчину HCl (для десорбції ϵ -ПЛ з смоли);
- приготування 6 М розчину NaOH (для підлуження перед доочищенням, іонообмінною адсорбцією та знебарвленням)

5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

Розглянувши можливі методи виділення та очищення ϵ -полілізину було теоретично розраховано кількість реактивів, необхідних на весь процес, та підібрано необхідне обладнання, дані значення наведені в таблиці 5.9.

Вихідні данні:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 5,184 \text{ м}^3$;
2. Концентрація біомаси у КР = 41,2 г/л;
3. Концентрація цільового продукту у КР = 32,6 г/л;
4. Втрати на стадіях виділення та очищення цільового продукту складають 30% ($5\,184 \text{ л} \times 32,6 \text{ г/л} = 168,998 \text{ кг} - 30\% = 118,3 \text{ кг}$)

Таблиця 5.9

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 21%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 8. Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	5,184 м ³ (5 184 л)	-	5,184 м ³ (5 184 л)	Збірник КР 6,3 м ³
ТП 9. Відділення біомаси						
2	ТП 9.1. Флокуляція	КР	5,184 м ³	-	-	Збірник КР 6,3 м ³
		Флокулянт	4,15 кг	-	-	
		6 М НСІ	27,43 л	-	-	Реактор-змішувач 40 л
3	ТП 9.2. Фільтрація	Біомаса	213,6 кг (5,184×41,2) 85 % 1 423,9	-	1 423,9 кг	Мембранний фільтр прес з об'ємом камери 2,1 м ³
		Фільтрат	3 760,1 (5 184-1 423,9)	112,8 л (3%)	3 647,3 л	
ТП 10. Доочищення від флокул які пройшли крізь мембрани фільтр-пресу						
4	ТП 10.1. Ультрафільтрація	6 М NaOH	39,1 л	-	-	Реактор-змішувач 100 л*
		Фільтрат	3 686,4 л (3 647,3 +39,1)			Збірник 4 м ³
		Ультраконтрат			1 474,56 л (3 686,4 -2 211,84)	

		Пермеат	2 211,84 л (3 686,4 л – 40%)	265,44 л (12%)	1 946,4 л	Ультрафільтраційна установка продуктивність 5 м ³ /год
ТП 11. Виділення ε-полілізину						
5	ТП 11.1. Іонообмінна екстракція ε-полілізину	6 М NaOH	8,25 л	-		Реактор-змішувач 100 л*
		Пермеат	1 954,65 л (1 946,4+8,25)			Збірник 2,5 м ³
		амберліт IRC-50 (1,5 л пермеату до 1 л смоли за годину)	325,7 л (1 954,65/6 тобто процес буде відбуватися 4 години)	-		Іонообмінна колона об'ємом 400 л
		Деіонізована вода (для промивання смоли 6 л на 1 л смоли)	7 817 л (325,7 × 6 × 4)	-		
		0,25 М HCl (розчин для елюювання ε-полілізину 7 л на 1 л смоли за годину)	9 120 л (325,7 × 7 × 4)	-		Реактор-змішувач 10 м ³
		Елюат	9 120 л	502 л (5,5%)	8 618 л	Збірник 10 м ³
6	ТП 11.2. Знебарвлення елюату	6 М NaOH	37,1 л			Реактор-змішувач 100 л*
		Елюат	8 655,1 л (8 618 + 37,1)			Збірник 10 м ³

		Макропориста смола SX-8 (1 л смоли на 1 л елюенту за годину)	1 731 л (8 655,1/5)			Іонообмінна колона об'ємом 2 м ³
		Знебарвлений розчин		432,8 л (5%)	8 222,3 л	Збірник 10 м ³
ТП 12. Концентрування						
7	ТП 12.1. Ультрафільтрація	Знебарвлений розчин	8 222,3 л	-	-	Ультрафільтраційна установка продуктивність 10 м ³ /год
		Ультраконцентрат	1 644,46 л (8 222,3 – 80%)	164,46 л (10%)	1 480 л	Збірник 2,5 м ³
		Пермеат			6 577,84 л (8 222,3 – 1 644,46)	
ТП 13. Сушіння						
8	ТП 13.1. Сушіння	Ультраконцентрат	1 480 л	-	-	Збірник 1,6 м ³
		Висушений ε-полілізин (вміст вологи 10%)	148 кг (1 480 – 90%)	22,2 (15%)	125,8кг	Збірник 200 л
ПМВ 14. Пакування						
9	ПМВ 14.1. Фасування, пакування, маркування порошку цільового продукту	Висушений ε-полілізин (вміст вологи 5%)	125,8 кг			
		Упакований в поліетиленовий пакет (по 100 г) цільовий продукт		3,8 (3%)	122 кг (1 220 упаковок)	Фасувально-пакувальна машина продуктивність 45уп/хв

*в даному реакторі відбувається приготування розчину 6 М NaOH на весь процес виділення

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт, виробничого біосинтезу та післяферментаційної ділянки виробництва ϵ -ПЛ.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр панельний ФВП-99-48-G4, фільтрувальний матеріал – хімволокно (поліестер), зафіксований на сітці, знаходиться в рамці з товщиною 48 мм; продуктивність – 7600 м ³ /год; E = 90 % [44]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Comprac F-3710; продуктивність 5,5 м ³ /хв, робочий тиск – 10 бар, габарити: 1400*1000*1500 мм; потужність приводу – 37 кВт [45]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач RDX 65, продуктивність 6,5 м ³ /хв, робочий тиск 14 бар, потужність приводу – 1,1 кВт [46]
РС-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 6000/8, об'єм – 6 м ³ , сталь, робочий тиск – 0,8 МПа [47]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник AVS 160, габарити: 265x290x304 мм; продуктивність 430 м ³ /год, оцинкована сталь, потужність 7,46 кВт [48]
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр комірковий ФВК-3-592-592-(300/600)-6-(F9); фільтрувальний матеріал – Meltblown, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; продуктивність – 3400 м ³ /год; E = 95 % [49]
ФІ-8	Фільтр індивідуальний	1	Фільтр МКР-305x305x78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 2,6 м ² , продуктивність – 130 м ³ /год; E = 99,995 % [50]
ІН-9	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - BLBIO-10SJ; висота – 1600 мм, довжина – 890 мм; ширина - 660; перемішування забезпечується механічною мішалкою; обладнаний датчиками температури, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [51]*

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобка О.В.			Розділ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.					66	124
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Н-10	Насос перистальтичний для перекачування розчину від ІН-9 у інокулятор ІН-17	1	Перистальтичний насос Dynamik. Максимальний тиск – до 3 бар, продуктивність 10 л/год (5,4 л за 32,4 хв) [52]
ДЗ-11 ДЗ-13 ДЗ-20 ДЗ-36	Об'ємно-ваговий дозатор	4	Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальна межа дозування – 0,2 кг, максимальна – 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм; дискретність відліку 0.005 г. [53]
Р-12	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину глюкози і дріжджового екстракту	1	Реактор сталевий емальований об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [54]
Р-14 Р-34 Р-35	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	3	Реактор з нержавіюча сталь 316L об'ємом 5 л; виробник – Тирит; діаметр 450 мм, висота 1430 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [55]
ФІ-15	Фільтр індивідуальний	1	Фільтр МКР-305х610х78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 5,4 м ² , продуктивність – 260 м ³ /год; Е = 99,995 % [50]
ІН-16	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - РФ-100; виробник - тм ПРОМВИТ; висота – 1600 мм, довжина – 1300 мм; ширина - 700; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується турбінною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [56]
ДЗ-17 ДЗ-28	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий автоматичний ДВМ-50. Мінімальна межа дозування – 5 кг, максимальна – 100 кг. Розміри: 1800х940х1950 мм. [57]
Р-18 Р-29 Р-50	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину глюкози і дріжджового екстракту	3	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 930 мм, висота – 2800 мм; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [54]
Н-19	Насос перистальтичний для перекачування розчину від Р-18 у інокулятор ІН-24	1	Перистальтичний насос МРС-6. Швидкість обертання 86 об/хв, продуктивність 108 л/год (67 л за 37,2 хв) [58]
Р-21	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	1	Об'єм апарату – 50 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання магнітної мішалки – 50 об/хв.; діаметр – 500 мм, висота – 1500 мм; виробник – BioTechno Group [59]
Н-22	Насос відцентровий для перекачування	1	Відцентровий насос ВРС 25-4ЕSА-180; Продуктивність 45 л/год (37 л за 49,3 хв) [60]

	розчину від Р-21 у інокулятор ІН-24		
ФІ-23	Фільтр індивідуальний	1	Фільтр МКР-457х457х78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 6,24 м ² , продуктивність – 300 м ³ /год; Е = 99,995 % [50]
ІН-24	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 1 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виробник - БИОТЕХНО; висота – 3260 мм, діаметр - 1438; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [61]*
ДЗ-25	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний АД-2000-2БЦ. Мінімальна межа дозування – 300 кг, максимальна – 2000 кг. Розміри: 1900*1400*3200 мм; дискретність відліку 1 кг. [66]
Р-26	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину глюкози	1	Об'єм апарату – 5,0 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання турбінної мішалки – 320 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 2220 мм, висота – 4555 мм; виробник – ООО «Дзержинськимаш-Комплект» [67]
Н-27 Н-33 Н-42	Насос перистальтичний для перекачування розчину від Р-26 у ферментер Ф-41, від Р-32 у Ф-41 та для перекачування культуральної рідини з Ф-41 в Р-46	3	Перистальтичний насос MS1. Максимальний тиск – до 15 бар, продуктивність 7500 л/год (4,0 м ³ за 32 хв) [68]
Н-30	Насос перистальтичний для перекачування розчину від Р-29 у ферментер Ф-41	1	Перистальтичний насос МР-8. Швидкість обертання 35 об/хв, продуктивність 140 л/год (80 л за 34,3 хв) [69]
ДЗ-31	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальна межа дозування – 120 кг, максимальна – 400 кг. Розміри: 1260*1100*2650 мм; дискретність відліку 0.2 кг. [62]
Р-32	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину глюкози і кукурудзяного глютену	1	Об'єм апарату – 1,0 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 2630 мм, висота – 6000 мм; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [63]
Р-37	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Об'єм апарату – 0,16 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 930 мм, висота – 2900 мм; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [63]

Н-38	Насос відцентровий для перекачування розчину від Р-37 у в Ф-41	1	Відцентровий насос BPS 32/12-220; Продуктивність до 7000 л/год [64]
ФІ-39	Фільтр індивідуальний	1	Фільтр МКР-530х530х78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 8,4 м ² , продуктивність – 400 м ³ /год; Е = 99,995 % [50]
З-40	Збірник для 25% розчину аміачної води	1	Збірник сталевий емальований об'ємом 10 л; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; довжина – 420 мм; ширина – 350 мм; висота 370 мм; [70]
Ф-41	Ферментер	1	Об'єм апарату – 10 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 5 800 мм, діаметр – 2 600; витримує тиск до – 0,6 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [63]
ПДЗ-43	Промисловий дозатор рідин	1	Мембранний насос дозатор НС151+ CST. Продуктивність 42 л/год, підходить для агресивних середовищ [71].
Р-44	Реактор-змішувач для приготування 6 М розчину НСІ	1	Об'єм апарату – 40,0 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 680 мм, діаметр – 500. [63]
ДЗ-45 ДЗ-49	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальна межа дозування – 0,2 кг, максимальна – 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм; дискретність відліку 0.005 г. [53]
Р-46	Реактор для зберігання культуральної рідини після виробничого біосинтезу	1	Об'єм апарату – 6,3 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 5880 мм, діаметр - 2630; перемішування забезпечується якірною мішалкою, швидкість перемішування 200 об/хв. [70]
Н-47 Н-52	Насос відцентровий для перекачування розчину від Р-46 у МФП-48; Від З-51 в УФ-53	2	Відцентровий насос JET150S PRIME; Продуктивність 12 000 л/год (5,6 м ³ за 28 хв) [72].
МФП-48	Мембранний фільтр-прес	1	Мембранний фільтр-прес ЧМ 150/30 – 1200х1200. Висота – 2600 мм, діаметр - 2800; об'єм камери – 2,1 м ³ [73].
З-51	Збірник для зберігання фільтрату після фільтр пресу	1	Об'єм апарату – 4,0 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 3250 мм, діаметр - 2250; перемішування забезпечується якірною мішалкою, швидкість перемішування 200 об/хв. [70]

УФ-53	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка ТСВ-УФС-10. Продуктивність 5 м ³ /год, робочий тиск 0,15 МПа, та встановлення ультрафільтраційної касети з відсіканням 5 кДа. [36, 37]
3-54 3-68	Збірник для зберігання пермеату після ультрафільтрації; зберігання ультраконцентрату після ультрафільтрації	2	Об'єм апарату – 2,5 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 2740 мм, діаметр - 2030; перемішування забезпечується якірною мішалкою, швидкість перемішування 200 об/хв. [70]
Н-55 Н-69	Насос відцентровий для перекачування розчину від 3-54 в ІК-59	2	Відцентровий насос JET150S PRIME; Продуктивність 4100 л/год [74]
ПДЗ-56	Промисловий дозатор рідин	1	Дозуючий насос плунжерний DRP-18. Продуктивність 408 л/год, підходить для агресивних середовищ [75].
Р-57	Реактор-змішувач для приготування 0,25 М розчину НСІ	1	Об'єм апарату – 10 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 6000 мм, діаметр - 2800; витримує тиск до – 0,6 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; [63]
Н-58 Н-60 Н-62 Н-64 Н-68	Насос відцентровий	5	Відцентровий насос LEO 3.0; Продуктивність до 18 м ³ /год [76]
ІК-59	Іонообмінна колона для виділення ε-полілізину	1	Іонообмінна колона – циліндричної форми виготовлена на замовлення в «Атомэнергомаш», висота – 2000 мм, діаметр – 550 мм, висота заповнення фільтрувального шару – 1200 мм, швидкість лінійного фільтрування 100 м/г. [77]
3-61 3-65	Збірник для зберігання елюату	2	Об'єм апарату – 10,0 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 4020 мм, довжина – 2700 мм; ширина – 2600 мм. [70]
ІК-63	Іонообмінна колона для знебарвлення елюату	1	Іонообмінна колона – циліндричної форми виготовлена на замовлення в «Атомэнергомаш», висота – 4500 мм, діаметр – 900 мм, висота заповнення фільтрувального шару – 2600 мм, швидкість лінійного фільтрування 100 м/г. [77]
УФ-67	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка ТСВ-УФС-20. Продуктивність 10 м ³ /год, робочий тиск 0,15 МПа та встановлення ультрафільтраційної касети з відсіканням 1 кДа. [36, 37]
3-68	Збірник для зберігання ультраконцентрату після	1	Об'єм апарату – 1,6 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 1770 мм, діаметр - 1650; перемішування забезпечується

	ультрафільтрації		якірною мішалкою, швидкість перемішування 200 об/хв. [70]
РС-70	Розпилювальна сушарка	1	Розпилювальна сушарка DPSD-500 з продуктивністю по випареній волозі 500 кг/год.[78]
ПЄ-71	Пересувна ємність для зберігання порошкоподібного ε-полілізину	1	Об'єм збірника циліндричної форми – 0,2 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь; висота – 1300 мм, діаметр – 500. [79]
ФПМ-72	Фасувально-пакувальна машина для порошку	1	Фасувально-пакувальна машина ПИТПАК. Продуктивність 45 упаковок/хв, максимальний об'єм пакування – 2 кг, пакувальний матеріал – поліетиленові пакети. [43]

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

Технологічна схема виробництва ϵ -полілізину бактеріями *S. albulus* LS-84 включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів, приготування та стерилізація підживлюючих розчинів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту, відділення біомаси, доочищення від флокул, виділення ϵ -полілізину, концентрування, сушіння та пакування).

Технологічна схема виробництва ϵ -полілізину (складається з двох частин: перша – доферментаційні процеси і виробничий біосинтез та другої частини в якій позначено післяферментаційні процеси) наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ-1) у найвищій точці $H = 20$ м.

ДР 1.2. Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 90\%$, затримуються частинки $\delta > 50$ мкм.

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 1,0 МПа.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобка О.В.					72	124
Перевір.		Скороцька О.І.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-осушувачі (Т-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (РС-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря (від ДР 1.4) нагрівають до температури 45-50 °С у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря має становити 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить на головний фільтр (Ф-7), установлений біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря має становити 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ФІ-8, ФІ-15, ФІ-23, ФІ-39) кожного біореактора (до ТП 6.5, ТП 6.6, ТП 6.7, ТП 7.1). Ступінь кінцевої очистки повітря становить $E = 99,995\%$ та $KUO = 0$.

ДР 2. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 2.1. Стерилізація піногасника

Для запобігання/зменшення утворення піни будемо використовувати піногасник 204, який вноситься в поживне середовище в концентрації 0,005 – 0,01 %. Для виробничого біосинтезу необхідно 523 мл даної речовини. Стерилізація буде відбуватися в автоклаві при 112°C 30 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 3.1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

Потрібно приготувати 100,6 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторі об'ємом 100 л.

Для цього в колбу об'ємом 250 мл наливають 83,3 мл питної води і додають при постійному перемішуванні 16,76 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 3.1.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 1 м³

Для приготування 996,3 мл 6%-ї хлоридної кислоти, в колбу об'ємом 2 л вносять 830,25 мл питної води і додають при постійному перемішуванні 166,05 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром.

ДР 3.1.3. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 10 м³

Для приготування 2 408,6 мл 6%-ї хлоридної кислоти, в реактор (P-34) об'ємом 5 л вносять 2 007,2 мл питної води і додають при постійному перемішуванні 401,4 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром.

ДР 3.2. Приготування 6% розчину NaOH

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

Для приготування 100,6 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду, який буде використаний на етапах нейтралізації середовища при приготуванні ПС для інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л, на технічних терезах зважити 6,03 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 250 мл і додають 100,6 мл питної води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 1 м³

Для приготування 996,3 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду на терезах зважують 59,8 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л і додають 996,3 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в ферментері об'ємом 10 м³

Для приготування 2 408,6 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду на терезах зважують 144,5 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в реактор (Р-35) об'ємом 5 л і додають 2 408,6 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в реакторі при 131°C впродовж 40 хв.

ДР 3.3. Приготування 6 М розчину хлоридної кислоти

В реактор (Р-44) об'ємом 40 л вносять 10,75 л питної води і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ПДЗ-43) додають при постійному перемішуванні 16,68 л 36%-ї хлоридної кислоти.

ДР 3.4. Приготування 0,25 М розчину хлоридної кислоти

В реактор (Р-57) об'ємом 10 м³ вносять 8 892 л питної води і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ПДЗ-56) додають при постійному перемішуванні 228 л 36%-ї хлоридної кислоти.

ДР 3.5. Приготування 6 М розчину гідроксиду натрію

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-49) в реактор (Р-50) об'ємом 100 л поміщають 20,26 кг кристалічного гідроксиду натрію і додають 84,85 мл питної води і перемішують до повного розчинення.

ДР 4. Приготування та стерилізація підживлювальних розчинів.

ДР 4.1. Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози

Для одержання 40 % розчину глюкози, через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-25), у реактор об'ємом 5 м³ (Р-26), подають 1 612,7 кг глюкози і додають 4 031,72 л води. Для кращого розчинення глюкози у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 320 об/хв.

Потім приготовлений розчин стерилізують у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація підживлювального розчину амоній сульфату

Через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-28) у реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-29) подають 49,744 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і 80 л води, реактор-змішувач обладнаний сорочкою. Для кращого розчинення солі у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин солі до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв.

Потім приготовлений розчин стерилізують у реакторі при 131°С упродовж 40 хв.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживного середовища.

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

Для вирощування інокуляту потрібно 540 мл поживного середовища (ПС). Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 540 мл наведено у табл. 7.1.

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 28,08 г глюкози та 2,7 г дріжджового автолізату і поміщають в колбу об'ємом 100 мл. Додають 70,2 мл питної води і перемішують до розчинення глюкози після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°С 30 хв.

Таблиця 7.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 540 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	52	28,08	Композиція А	70,2
Дріжджовий автолізат	5	2,7		
Вода		70,2 (мл)		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,05	0,027	Композиція В	235,8
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,04	0,0216		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	0,0162		
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	5,4		
Вода		235,8 (мл)		
K ₂ HPO ₄	0,8	0,432	Композиція С	234
KH ₂ PO ₄	1,36	0,7344		
Вода		234 (мл)		

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують (г): 5,4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,027 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0216 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і 0,0162 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 235,8 мл питної води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131°C впродовж 40 хв.

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції С

На технічних вагах зважують (г): 0,432 K_2HPO_4 і 0,7344 KH_2PO_4 і поміщають в колбу об'ємом 500 мл. Додають 234 мл питної води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131°C впродовж 40 хв.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л (ІН-9), потрібно приготувати 5,4 л поживного середовища. Для засіву даного інокулятора потрібно внести 540 мл посівного матеріалу. Вміст компонентів для приготування 5,4 л середовища наведено у табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,4 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	52	280,8	Композиція А	0,7
Дріжджовий автолізат	5	27		
Вода		0,7 (л)		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,27	Композиція В	2,4
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,04	0,216		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03	0,162		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	54		
Вода		2,35 (л)		
K_2HPO_4	0,8	4,32	Композиція С	2,3
KH_2PO_4	1,36	7,344		
Вода		2,35 (л)		

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 280,8 г глюкози та 27 г дріжджового автолізу і поміщають у колбу об'ємом 2 л. Додають 0,7 л питної води і перемішують до розчинення глюкози і дріжджового екстракту після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при 112°C 30 хв.

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують (г): 54 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,27 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,216 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і 0,162 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і поміщають в колбу об'ємом 5 л. Додають 2,4 л питної води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131°C впродовж 40 хв.

ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції С

На технічних вагах зважують (г): 4,32 K_2HPO_4 і 7,344 KH_2PO_4 і поміщають в колбу об'ємом 5 л. Додають 2,3 л питної води і перемішують до розчинення солей після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують у автоклаві при 131°C впродовж 40 хв.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л (ІН-17), потрібно приготувати 53,42 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 53,42 л середовища наведено у табл. 7.3.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 5,4 л посівного матеріалу. Зважаючи на стерилізацію яка відбувається гострою парою та проходить у посівному апараті необхідно врахувати конденсат (10%) тоді об'єм води, потрібний для приготування композиції А і Б, становить 48,57 л.

Таблиця 7.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 53,42 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	52	2 777,8	Композиція А	6,32
Дріжджовий автолізат	5	267,1		
Вода		6,32 (л)		
Конденсат		0,632 (л)		0,632
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,05	2,67	Композиція В	42,25
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,04	2,14		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	1,603		
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	534,2		
K ₂ HPO ₄	0,8	42,74		
KH ₂ PO ₄	1,36	72,65		
Вода		42,25 (л)		
Конденсат		4,22		

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2 777,8 г глюкози та 267,1 г дріжджового автолізату. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом (Р-12) 10 л, через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-11) додають 6,32 л води. Для кращого розчинення глюкози і дріжджового екстракту у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40°C при перемішуванні 100 об/хв.

Стерилізацію проводять безпосередньо у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують (г): 534,2 (NH₄)₂SO₄, 2,67 MgSO₄×7H₂O, 2,14 ZnSO₄×7H₂O, 1,603 FeSO₄·7H₂O, 42,74 K₂HPO₄ і 72,65 KH₂PO₄ і поміщають у реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-14), обладнаний сорочкою, і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-13) додають 3,25 л води. Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей. Потім розчин подають у ферментер об'ємом 100 л (ІН-16), обладнаний сорочкою і мішалкою, і додають 39 л води, додають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.1.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³.

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м³ (ІН-24), потрібно приготувати 528,91 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 528,91 л середовища наведено у табл. 7.4.

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 53,42 л посівного матеріалу. Зважаючи на стерилізацію яка відбувається гострою парою та проходить у посівному апараті необхідно врахувати конденсат (10%) тоді об'єм води, потрібний для приготування композиції А і Б, становить 480,83 л.

Таблиця 7.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 528,91 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	52	27 503,32	Композиція А	62,53
Дріжджовий автолізату	5	2 644,55		
Вода		62,57 (л)		
Конденсат		6,257 (л)		6,253
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,05	26,45	Композиція В	418,3
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,04	21,16		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	15,87		
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	5 289,1		
K ₂ HPO ₄	0,8	418,3		
KH ₂ PO ₄	1,36	719,32		
Вода		418,67 (л)		
Конденсат		41,83		41,83

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2 644,55 г дріжджового автолізату. Наважку поміщають у реактор об'ємом 100 л (Р-18), через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-17) додають 27 503,32 г глюкози та 62,53 л води. Для кращого розчинення глюкози і дріжджового екстракту у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40°C при перемішуванні 50 об/хв.

Стерилізацію проводять безпосередньо у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують (г): 5 289,1 (NH₄)₂SO₄, 26,45 MgSO₄×7H₂O, 21,16 ZnSO₄×7H₂O, 15,87 FeSO₄·7H₂O, 418,3 K₂HPO₄ і 719,32 KH₂PO₄ і поміщають у реактор об'ємом 50 л (Р-21), обладнаний сорочкою, і за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-20) додають 38,3 л води. Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей. Потім розчин за допомогою відцентрового насоса (Н-22) подають у ферментер об'ємом 1 м³ (ІН-24) з сорочкою і мішалкою, і вносять 380 л води, після додають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.1.2) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу S. albulus LS-84 у ферментері на 10 м³

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³ (Ф-41), потрібно приготувати 5 236,21 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 5 236,21 л середовища наведено у табл. 7.5.

Для засіву даного ферментера потрібно внести 528,91 л рідкого посівного матеріалу. Зважаючи на стерилізацію поживного середовища, яка відбувається у посівному апараті необхідно врахувати конденсат (10%) та об'єм підживлюючого розчину тоді об'єм води, потрібний для приготування композиції А і Б, становить 1 094,8 л.

ДР 5.5.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-31) подають 104 724,2 г (або 104,7242 кг) кукурудзяного глютену у реактор-змішувач об'ємом 1 м³ (Р-32), обладнаний сорочкою, і додають 218,8 л холодної води. Після цього глютен розварюють за температури 70-90 °С впродовж 30 хв, подаючи глуху пару у сорочку збірника. Потім за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-31) до розчин розвареного кукурудзяного глютену додають 272 282,9 г глюкози та вносять 400 л води. Для кращого розчинення глюкози у сорочку реактора подають гарячу пару і

нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять безпосередньо у реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

Таблиця 7.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 м³

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 5 236,21 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний глютен	20	104 724,2	Композиція А	618,8
Глюкоза	52	272 282,9		
Вода		618,8 (л)		
Конденсат		61,88		61,88
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,05	261,81	Композиція В	476
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,04	209,45		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	157,09		
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	52 362,1		
K ₂ HPO ₄	0,8	4 188,97		
KH ₂ PO ₄	1,36	7 121,25		
Вода		476		
Конденсат		47,6		47,6

ДР 5.5.2. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-36) у реактор-змішувач об'ємом 0,16 м³ (Р-37), обладнаний сорочкою, подають (г): 52 362,1 (NH₄)₂SO₄, 261,81 MgSO₄×7H₂O, 209,45 ZnSO₄×7H₂O, 157,09 FeSO₄·7H₂O, 4 188,97 K₂HPO₄, 7 121,25 KH₂PO₄ та додають 106 л води. Для кращого розчинення солей у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Потім розчин за допомогою відцентрового насоса (Н-38) подають у ферментер об'ємом 10 м³ (Ф-41) з сорочкою і мішалкою, і вносять 370 л води, після додають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.1.3) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *S. albulus* LS-84 зберігають у пробірках на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА). Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять в строго асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем МПА, в асептичних умовах розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим середовищем. Вирощують при температурі 30°C упродовж 24 год.

ТП6.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Ізольовані колонії (від ТП 6.2) в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 год).

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу з композицією В (від ДР 5.1.2), вносять 66,3 мл композиції А (від ДР 5.1.1) і 221 мл композиції С (від ДР 5.1.3). Розчин перемішують і розливають по 127,5 мл в чотири стерильні качалочні колби на 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. albulus* LS-84, вирощеною на МПА, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Штам вирощують у колбі на качалці (220 об/хв) при 30 °С упродовж 24 год.

Після завершення вирощування здійснюють мікробіологічний контроль в кожній з колб. В асептичних умовах інокулят з 4 колб переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (ІН-9) об'ємом 10 л вносять композицію А об'ємом 0,66 л (від ДР 5.2.1), композицію В об'ємом 2,21 л (від ДР 5.2.2) та композицію С об'ємом 2,2 л (від ДР 5.2.3).

Після об'єднання композицій, через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 6.4).

Культивування здійснюють при температурі 30°C упродовж 24 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль і визначають концентрацію біомаси ($x=20-21$ г/л).

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В посівний апарат (ІН-17) об'ємом 100 л з простерилізованим розчином композиції В (від ДР 5.3.2), самоплино з реактора (Р-18) вносять композицію А (від ДР 5.3.1). За допомогою колби вносять 6%-ий розчин NaOH для досягнення оптимального значення рН 6,8 (від ДР 3.2.1).

Після цього в посівний апарат подають інокулят (за допомогою перистальтичного насоса (Н-10) від ТП 6.5).

Культивування здійснюють при температурі 30°C упродовж 24 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль посівного матеріалу, визначають концентрацію біомаси ($x = 20-21$ г/л).

ТП 6.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³

У посівний апарат (ІН-24) з стерильною композицією В за допомогою перистальтичного насоса (Н-19) вносять композицію А (від ДР 5.4.1) у кількості 64,8 л. За допомогою колби вносять 6%-ий розчин NaOH для досягнення оптимального значення рН 6,8 (від ДР 3.2.2).

Після цього в посівний апарат подають інокулят (через трубу перетискування від ТП 6.6).

Культивування здійснюють при температурі 30°C упродовж 24 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Кожні 3-4 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль посівного матеріалу., визначають концентрацію біомаси ($x = 20-21$ г/л).

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробничий біосинтез

У ферментер об'ємом 10 м³ (Ф-41) з композицією В за допомогою перистальтичного насосу (Н-33) подають стерильну композицію А об'ємом

680,68 л (від ДР 5.5.1). Самоплином з реактора (Р-35) вносять 6%-ий розчин NaOH для досягнення оптимального значення рН 6,8 (від ДР 3.2.3). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 6.7).

Під час виробничого біосинтезу рН культуральної рідини поступово знижується і приблизно на 20 год культивування досягає позначки рН = 3,8, весь наступний час біосинтезу рівень рН підтримується на даній позначці додаванням 25 %-им розчином аміачної води самопливом з збірника об'ємом 10 літрів (3-40).

Упродовж культивування концентрація глюкози знижується, тому починаючи з 40 год і потім через кожні 20 год культивування з реактора (Р-26) за допомогою перистальтичного насоса (Н-27) подається підживлювальний 40%-й розчин глюкози (від ДР 4.1) для підтримання концентрації глюкози у культуральній рідині ≈ 10 г/л упродовж всього процесу виробничого біосинтезу.

У разі зниження концентрації NH_4^+ у ферментер, за допомогою перистальтичного насоса (Н-30), автоматично подається підживлювальний розчин амоній сульфату (від ДР 4.2), для того, щоб підтримувати концентрацію джерела азоту в межах 0,2-0,3 г/л.

У процесі біосинтезу для уникнення піноутворення, в ферментер подається хімічний піногасник та встановлюється механічний піногасник (у верхній частині ферментера встановлена мішалка, яка усуває піну в результаті зрізових зусиль).

У процесі культивування кожні 12 год відбирають проби культуральної рідини для визначення концентрації вуглецю, азоту, ϵ -полілізину та для здійснення мікробіологічного контролю.

Культивують до концентрації біомаси та концентрації ϵ -полілізину 41,2 г/л і 32,6 г/л, відповідно, при температурі 30°C упродовж 196 год.

Після завершення культивування культуральну рідину подають в реактор на зберігання.

ТП 8. Зберігання культуральної рідини

ТП 8.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину після виробничого біосинтезу за допомогою перистальтичного насоса (Н-42) подають в реактор-змішувач (Р-46) об'ємом 6,3

м³, де відбувається зберігання при температурі 20 °С до початку стадій виділення та очищення.

ТП 9. Виділення біомаси

ТП 9.1. Флокуляція

До культуральної рідини, яка знаходиться в реакторі-змішувачі (Р-46) об'ємом 6,3 м³, самоплином (від ДР 3.3) з реактора (Р-44) подають 27,43 л 6 М НСІ для пониження рівня рН до 1,5. Потім при постійному перемішуванні, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-45) додають 4,15 кг поліакрилат натрію, впродовж перших 2 хв швидкість перемішування 200 об/хв, а потім швидкість перемішування понижується до 75 об/хв і відбувається впродовж 3 хв.

ТП 9.2. Фільтрація

Профлукуювану культуральну рідину (від ТП 9.1) за допомогою відцентрового насоса (Н-47) подають до фільтр-преса (МФП-48). Профільтрований розчин надходить у збірник (З-51) об'ємом 4 м³, де відбувається зберігання до наступного етапу.

ТП 10. Доочищення від флокул

ТП 10.1. Ультрафільтрація

До фільтрату об'ємом 3 647,3 л (від ТП 9.2) з реактора (Р-50) самоплином подають 39,1 л 6 М NaOH (від ДР 3.5) для збільшення рівня рН до 6,5. Отриманий розчин насосом (Н-52) подають на ультрафільтраційну установку (УФ-53), для доочищення від високомолекулярних розчинених речовин які пройшли крізь пори фільтр-преса. В модулі ультрафільтраційної установки відбувається поділ розчину з відсіканням молекулярної маси 5 кДа при 0,1-0,15 МПа. Отриманий пермеат надходить в збірник (З-54) де відбувається зберігання до використання в наступному етапі.

ТП 11. Виділення ε-полілізину

ТП 11.1. Іонообмінна екстракція ε-полілізину

В іонообмінну колону (ІК-59), вносять 325,7 л слабкислої катіонообмінної смоли амберліт IRC-50. До пермеату (від ТП 10.1) в збірник (З-54) самоплино подають 8,25 л 6 М NaOH (від ДР 3.5) для збільшення рівня рН до 8,5. Після врегулювання рівня рН розчин в кількості 1 954,65 л за допомогою насоса (Н-55)

подають в іонообмінну колону (що дорівнює швидкості 1,5 л пермеату на 1 л смоли за годину). Після завантаження пермеату в колону, відбувається промивання смоли деіонізованою водою, вода в кількості 1 954,2 л (6 л водин на 1 л смоли) подається до колони. Потім до іонообмінної колони з реактора (Р-57) насосом (Н-58) подають 2 279,9 л 0,25 М НСІ для елюювання ε-ПЛ з смоли (що дорівнює швидкості 7 л елюенту на 1 л смоли за годину). Отриманий елюат зберігають в збірнику (З-61) об'ємом 10 м³.

ТП 11.2. Знебарвлення елюату

В іонообмінну колону (ІК-63), вносять 1 731 л макропористої смоли SX-8. До елюату (від ТП 11.1) в збірник (З-61) самоплином подають 37,1 л 6 М NaOH (від ДР 3.5) для збільшення рівня рН до 7,0. Потім розчин в кількості 1 731 л за допомогою насоса (Н-62) подають в колону де він проходить крізь смолу і знебарвлюється. Знебарвлений розчин за допомогою насоса (Н-64) подається в збірник (З-65) об'ємом 10 м³.

ТП 12. Концентрування

ТП 12.1. Ультрафільтрація

Знебарвлений розчин об'ємом 8 222,3 л (від ТП 11.2) з збірника (З-65) насосом (Н-66) подають в ультрафільтраційну установку (УФ-67), для концентрування розчину. В модулі ультрафільтраційної установки відбувається поділ розчину з відсіканням молекулярної маси 1 кДа при 0,1-0,15 МПа. Отриманий концентрат подається в збірник (З-68) де відбувається зберігання до використання в наступному етапі.

ТП 13. Сушіння

ТП 13.1. Сушіння концентрату

Концентрат об'ємом 1 480 л (від ТП 12.1) з збірника (З-68) насосом (Н-69) подається до розпилювальної сушарки (РС-70), де відбувається його сушіння при температурі 120 °С. В якості сушильного агента виступає нагріте повітря, в результаті отримуємо готовий напівпродукт – порошкоподібний ε-полілізин. Після закінчення процесу сушіння порошок подається в пересувну ємність (ПЄ-71).

ПМВ 14. Пакування та маркування

ПМВ 14.1. Пакування та маркування порошкоподібного ε-полілізину

ε-Полілізін випускають у вигляді порошкоподібної речовини і фасують за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФПМ-72) у поліетиленові пакети по 100 г. На готовий продукт наносять маркування, вказують назву товару, дату виготовлення, номер серії та термін придатності, поліетиленові пакети поміщають в картонні коробки, які складають на палети і направляють на склад.

ЗВ 15. Знешкодження відходів

ЗВ 15.1. Знешкодження рідких відходів

Залишки титрувальних розчинів (від ДРЗ.1.1, ДРЗ.1.2, ДРЗ.1.3, ДРЗ.2.1, ДРЗ.2.2, ДРЗ.2.3, ДРЗ.3, ДРЗ.4, ДРЗ.5), ультраконцентрат (від ТП10.1), промивна вода (від ТП11.1) та пермеат (від ТП12.1) утилізують, направляючи на очисні споруди.

ЗВ 15.2. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря, яке надходить від інокуляторів, ферментера (від ТП 6.5, ТП 6.6, ТП 6.7, ТП 7.1) та розпилувальної сушарки (від ТП13.1) відправляють у системи очищення повітряних відходів.

ЗВ 15.3. Знешкодження твердих відходів

Біомаса яка залишається після фільтрування культуральної рідини (від ТП9.2) направляється на утилізацію.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок виробництва ε-полілізину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр, термометр	Після компресування повітря	P = 1 МПа t = 120-200 °C
Кт 1.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 30 °C
Кт 1.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60%
Кт 1.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання	t = 40 °C
Кт 1.7 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головному фільтрі	E = 95%
Кт 1.8 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995%

НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Жолобка О.В.		
Перевір.		Скряцька О.І.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
Розділ 8. Контроль виробництва			Літ.	Арк.
				89
			Аркушів 124	
Кафедра БТМ				

<p>Кт 2.1. Приготування та стерилізація піногасника</p> <p>Стерилізація піногасника</p>	<p>Піногасник Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кх 3.1.1, 3.1.2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів</p> <p>Приготування 6% розчину НСІ</p>	<p>Розчин НСІ Концентрація</p>		<p>Після приготування розчину</p>	<p>$c = 6\%$</p>
<p>Кт, Кх, Км 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів</p> <p>Приготування 6% розчину NaOH</p>	<p>Розчин NaOH Температура, тиск, час, концентрація, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$c = 6\%$, $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.1. Приготування та стерилізація підживлювальних розчинів</p> <p>Приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози</p>	<p>Розчин глюкози Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05$ МПа, $\tau = 20$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.2. Приготування та стерилізація підживлювальних розчинів</p> <p>Приготування та стерилізація підживлюючого розчину амоній сульфату</p>	<p>Розчин амоній сульфату Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в</p>	<p>Композиція А Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05$ МПа, $\tau = 20$ хв, відсутність мікробіоти</p>

колбах на качалках Приготування і стерилізація композиції А				
Кт, Км 5.1.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, 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
Кт, Км 5.1.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках Приготування і стерилізація композиції С	Композиція С Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, 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
Кт, Км 5.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, p = 0,05 МПа, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Композиція В Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, 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 композиції В				
Кт, Км 5.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Приготування і стерилізація композиції С	Композиція С Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, 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
Кт, Км 5.3.1, 5.4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, p = 0,05 МПа, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.2, 5.4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, 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
Кт, Км 5.5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу Стерилізація композиції А	Композиція А Температура, тиск, час, відсутність мікробіоти	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 130 °С, p = 0,15 МПа, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 6.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Streptomyces albulus</i> LS-84 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Датчик температури, годинник мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічни й контроль при пересівах кожні 3 місяці	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, відсутність сторонньої мікробіоти.
Кт, Км 6.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Колекційна культура <i>Streptomyces albulus</i> LS-84 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічни й контроль проводять кожні 8 годин	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 Вирощування культури на рідкому середовищі	Колекційна культура <i>Streptomyces albulus</i> LS-84 Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічни й контроль проводять кожні 8 годин	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічни й контроль проводять кожні 8 годин	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Датчик температури, годинник, тахометр, датчик піноутворення, датчик рН, мікроскоп	Температура, швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічни й контроль мікроскопіюван ням проводять кожні 8 годин	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 220$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км, Кх 6.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність мікроорганізмів	Датчик температури, годинник, тахометр, датчик піноутворення, датчик рН, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 220 об/хв, рН = 6,8 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.7 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1 м ³	Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність мікроорганізмів	Датчик температури, годинник, тахометр, датчик піноутворення, датчик рН, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 8 годин	t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 220 об/хв, рН = 6,8 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 7.1 Виробничий процес у ферментері об'ємом 16 м ³	Культуральна рідина, Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, рівень піни, мікробіологічна чистота культури, концентрація ε-полілізину, концентрація біомаси	Датчик температури, годинник, тахометр, датчик піноутворення, датчик рН, мікроскоп	Температура, рН і швидкість обертання визначаються і контролюються безперервно, мікробіологічний контроль мікроскопіюванням проводять кожні 12 годин	t = 30 °С, τ = 196 год, ω = 220 об/хв, рН = 6,8 C _{глюкози} = 10 г/л C _{NH₄⁺} = 0,2 г/л C _{ε-полілізину} = 32,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем і мікроскопіювання. Мікробіологічний контроль відбувається у два етапи: перший етап – мікроскопіювання, а другий – висів методом виснажуючого штриха на чашки Петрі.

Морфологічної характеристики для *S. albulus* LS-84 на сьогоднішній день немає, але в статті [80] описуються морфологічні характеристики для мікроорганізму *S. albulus* 436, який проявляє схожі властивості до синтезу ε-ПЛ.

Зазвичай на виробництві немає достатньо часу для очікування результатів мікробного контролю висівом на чашки Петрі, тому частіше використовують метод мікроскопіювання.

Чистоту випробуваної культури та її морфологію оцінюють методом світлової мікроскопії. Зріла спора має еліпсоїдальну форму, з приблизним розміром 1,2-1,5 мкм та голчастою поверхнею.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій і з сусло-агаром (СА) – для грибів і дріжджів.

У даної культури субстратний міцелій блідо-жовтого кольору. Повітряний міцелій характерний при рості на тирозиновому агарі та деяких інших подібних ростових субстратах на всіх інших наявність повітряного міцелію не спостерігається. Зрілий спорульований повітряний міцелій зазвичай сірого або сірувато-коричневого кольору [80].

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Визначення концентрації біомаси

Після завершення культивування міцелій *S. albulus* LS-84 відділяють фільтруванням культуральної рідини. Залишки міцелія осаджують центрифугуванням 6000 g, 20 хв. Міцелій висушують упродовж 10 год за температури 100°C у вакуумній печі до постійної ваги. Після висушування суху біомасу зважують і перераховують у г/л [30].

8.3.2. Концентрація цільового продукту

Концентрація ϵ -ПЛ визначається за допомогою методу Ітхакі [81]. Методу Ітхакі був винайдений в 1972 році, у ході досліджень спрямованих на визначення відсотка вільних ДНК-фосфатних груп в хроматині (1,2) шляхом їх зв'язування з полілізином [82].

Принцип методу. Метод базується на реакції аніонного барвника метилового помаранчевого (МП) з лізином при таких умовах, що складний осад (незв'язаний МП) оцінюють по абсорбції супернатанту.

Техніка виконання. Пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл поміщають у центрифужну пробірку, центрифугують протягом 5 хв за частоти обертання

2500 об/хв. 0,1 мл супернатанту додають до суміші 1,9 мл фосфатного буфера та 2,0 мл метилового помаранчевого розчину в пробірці об'ємом 15 мл. Суміш струшують на шейкері впродовж 30 хв. Після цього суміш центрифугують за 400 g упродовж 15 хв. Оптичну густину отриманого супернатанту вимірюють при довжині хвилі 465 нм. Концентрацію ϵ -ПЛ обчислюють з калібрувальної кривої, побудованої за серією стандартних розчинів ϵ -ПЛ.

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Концентрація джерела вуглецю. Основним джерелом вуглецю в середовищі культивування є глюкоза. Концентрацію глюкози визначають за допомогою біосенсора SBA-40C обладнаний електродами глюкозооксидази [30].

Дія біосенсорного аналізатор SBA-40C заснована на іммобілізованому ферменті як ключовому компоненті, а інтелектуальний інструмент з двома індексами управляється мікрокомп'ютером. У нього є два електрода для біологічного виявлення, він може використовувати один зразок для отримання результатів кількісного аналізу двох речовин одночасно, після вимірювання автоматично відбувається цикл промивання, а потім проводиться наступне вимірювання. Комп'ютер може автоматично калібруватися для досягнення точних кількісних результатів вимірювань [83].



Рис.8.1. Біочутливий аналізатор SBA-40C

Принцип роботи біоаналізатора SBA-40C. Виконує кількісну оцінку джерела вуглецю (глюкози) за допомогою ферментативної реакції.

Принцип дії: іммобілізований фермент каталізує утворення глюконової кислоти, пірувату та інших продуктів з певного субстрату та утворює перекис

водню, який далі відновлюється на аноді, що призводить до збільшення сили струму. Струм, який виникає під час вимірювання, пропорційний концентрації глюкози в зразку. Комп'ютер зчитує дані і виводить кількість досліджуваного зразка.

У виробничій практиці розведення зразка можна регулювати відповідно до фактичної ситуації, тим самим додатково підвищуючи точність виявлення та аналізу за допомогою біосенсора.

Концентрація джерела азоту. Основним джерелом азоту в середовищі культивування є $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Зазначимо, що $\text{NH}_4^+\text{-N}$ в основному визначається за допомогою колориметричного методу з використанням реактиву Несслера [30].

Принцип методу. Метод заснований на властивості реактиву Несслера давати кольорову реакцію з іонами амонію.

Техніка виконання. Пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл поміщають у центрифужну пробірку, центрифугують протягом 5 хв за частоти обертання 2500 об/хв. 0,2 мл супернатанту поміщають у пробірку з боросилікатного скла (25x200 мм) з 1 мл дистильованої води. Після цього додають 0,5 г сірчанокислового калію, 0,5 мл розчину сульфату ртуті, і 1,5 мл концентрованої сірчаної кислоти. До даного розчину додають скляну кульку і починають кип'ятити упродовж 30 хвилин. Необхідно приділити увагу запобіганню вивільненню парів з пробірки. Пробірки трохи охолоджують, а речовини із сторін змивають за допомогою 5 мл дистильованої води. Після цього додають 0,2 мл цинкового пилу для зв'язування зі ртуттю, і суміш обережно нагрівають протягом 2-3 хв поки не відбудеться видимої реакції цинку з розчином. Потім суміш охолоджують, після чого при безперервному перемішуванні додають 7,5 мл натрій гідроксиду. Пробірки охолоджують до кімнатної температури і об'єм доводять до 15 мл дистильованою водою.

У пробірку з 10 мл дистильованої води додають 0,5 мл приготованого розчину. Пробірку поміщають у крижану воду приблизно на 5 хвилин, потім додають 1,5 мл реагенту Несслера. Пробірку закривають корком і залишають у крижаній воді. Інтенсивність кольору визначається через 15 хв на фотоелектричному колориметрі при довжині хвилі 450 нм. Вміст азоту

оцінюється за стандартною кривою між показаннями колориметра та вмістом азоту, отриманими обробкою ряду стандартів азоту, від 0 до 1000 мг.

Макровизначення азоту. Якщо виявлено, що вміст азоту в зразку перевищує 750 мг, то точність підвищується шляхом розведення приготованого розчину 1 до 1. Повторне визначення кольоровості досліджуваної проби проводять на другій пробі об'ємом 0,5 мл. Вміст азоту визначається зі стандартної кривої [84].

8.4. Показники якості готового продукту

Для контролю готової порошкоподібної субстанції ϵ -полілізину проводять такі випробування: опис, ідентифікація, кількісний вміст ϵ -полілізину, втрата маси при висушуванні (вода), рН розчину та антимікробна активність.

Опис.

Гігроскопічний порошок світло-жовтого кольору з гіркуватим смаком [85].

Ідентифікація.

Наважку субстанції ϵ -полілізину кількістю 0,05 г розчиняють у 5 мл 0,7 мМ буферного розчину натрію фосфату (рН 6,9). Отриманий розчин очищують гелевою фільтрацією на колонці зі смолою Sephadex G-25 fine (20*1,5 см), використовуючи 0,7 мМ буферний розчин натрію фосфату як елюент. Далі смужку з фільтрувального паперу вмочують у 0,2%-ий розчин нінгідрину в ацетоні та висушують її за температури 80 °С. На висушену смужку наносять краплю отриманого елюату та фіксують наявність полілізину у розчині за утворенням пурпурового забарвлення внаслідок реакції полілізину з нінгідрином [82].

Кількісний вміст ϵ -полілізину.

Вміст ϵ -полілізину визначають колориметричним методом [86]. Наважку субстанції кількістю 5 мг розчиняють у 10 мл води очищеної (з метою отримання розчину полілізину концентрацією 0,5 мг/мл). З отриманого розчину відбирають 0,1 мл у центрифужну пробірку, додають 1,9 мл 0,1 мМ фосфатного буферу (рН 6.6) та 2,0 мл 0,1 мМ розчину метилового помаранчевого. Утвориться осад (результат реакції між катіонами полілізину та аніонами метилового

помаранчевого), який відділяють центрифугуванням за 2500 об/хв протягом 5 хв. Визначають оптичну густину отриманого супернатанту на спектрофотометрі за довжини хвилі 465 нм відносно 0,1 мМ розчину фосфатного буферу, після чого визначають концентрацію ϵ -полілізину в зразку за калібрувальним графіком. Вміст ϵ -полілізину повинен бути не менше 95% [85].

Втрата маси при висушуванні (вода).

Наважку субстанції ϵ -полілізину масою 1 г поміщають у попередньо висушений і зважений бюкс (з відкритою кришкою), висушують у сушильній шафі за температури 100 °С до постійної маси. Далі відкритий бюкс разом з кришкою поміщають в ексікатор для охолодження на 50 хв, після чого його закривають кришкою, зважують і обчислюють втрату маси при висушуванні [ДФУ, р. 2.2.32]. Втрата маси при висушуванні не має перевищувати 5% [85].

Мікробіологічна чистота.

Дослідження мікробіологічної чистоти проводять згідно з ДФУ, р. 2.6.12. Контролюють загальний вміст аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів в 1 г субстанції. 10 г субстанції полілізину розчиняють у 100 мл буферного розчину з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0), отримуючи *робочий розчин*. У чашки Петрі вносять 15-20 мл розплавленого щільного поживного середовища МПА для визначення бактерій та середовища Сабуро для визначення грибів і дають середовищу застигнути. Підсушують чашки в термостаті. 0,1 мл отриманого розчину розподіляють по поверхні поживного середовища шпателем Дригальського. Для кожного розведення використовують не менше двох чашок Петрі з кожним поживним середовищем. Посіви інкубують за температури від 30-35°C (20-25°C для грибів) протягом п'яти діб. Відбирають чашки, відповідні одному розведенню, для якого кількість колоній на одній чашці Петрі не перевищує 300 для бактерій і 100 – для грибів. Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній і визначають число колонієутворюючих одиниць у грамі. В 1 г субстанції допускається не більше 10^3 клітин бактерій і 10^2 клітин мікроміцетів і дріжджів.

РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва

9.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації

Для автоматизації обираємо ділянку сушіння цільового продукту-розпилювальне сушіння.

Щоб отримати ϵ -полілізин, який є продуктом метаболізму *Streptomyces albulus* LS-84 важливою стадією є отримання сухого порошку. Для досягнення даної мети оптимальним є використання розпилюючої сушарки, оскільки ϵ -ПЛ не втрачає своїх властивостей при температурі 120 °С впродовж 20 хв.

Для висушування ϵ -полілізину концентрат об'ємом 1 480 л з збірника об'ємом 1,6 м³ перекачується насосом до розпилювальної сушарки, де відбувається його сушіння при температурі 120 °С. В якості сушильного агента виступає нагріте повітря, в результаті отримуємо готовий напівпродукт – порошкоподібний ϵ -полілізин. Після закінчення процесу сушіння порошок подається в пересувну ємність.

В результаті аналізу технологічного процесу зроблені висновки, що автоматизація повинна забезпечувати:

1. Контроль і управління за рівнем рідини у збірнику проміжного продукту з управлінням подачі рідини у збірник до 70 %.
2. Управління насосом перекачки рідини («включено», «відключено») із збірника у розпилюючу сушарку
3. Контроль температури теплоносія у розпилюючій сушарці на вході в камеру по місцю.
4. Контроль і регулювання температури в камері у розпилюючій сушарці шляхом впливу на витрату пари.

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобка О.В.			Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.І.					100	124
Консультант		Клименко О.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Таблиця 9.1

Завдання на розробку системи автоматизації

Машина, агрегат, установка		Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
Розпилююча сушарка	Збірник проміжного продукту	Рівень рідини в апараті	70%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Управління	Автоматичне	Вплив на подачу концентрату в збірник
	Насос	Стан насосу	Ввімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Дія на двигун насосу, АРМ оператора
	Розпилювальна сушарка	Температура теплоносія на вході в камеру	105°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Швидкість обертання розпилюючого пристрою	15 тис.об./хв	Контроль
	Управління	Дистанційне	Пуск/зупинка двигуна			
	Розвантажувальні циклони	Швидкість подачі повітря	2000 м ³ /год	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на подачу повітря

5. Контроль і управління швидкості обертання розпилюючого пристрою у розпилюючій сушарці шляхом дії на «пуск/зупинка» двигуна.

6. Контроль і регулювання швидкості подачі повітря у розвантажувальних циклонах шляхом впливу на подачу повітря.

9.2 Опис схеми автоматизації з специфікацією засобів автоматизації

У 1 контурі автоматичного контролю і управління в розпилювальній сушарці контролюється і здійснюється управління рівнем рідини в апараті, який повинен становити 70 %. Спостереження за зміною здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням змін в архіві.

Управління рівнем рідини здійснюється за допомогою впливу на подачу концентрату в збірник.

У 2 контурі управління роботою двигуна насосу здійснюється з АРМі оператора включенням - відключенням насосів. Ручне управління з щита перетворювачів включенням - відключенням насосів та аварійне відключення насосів кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

У 3 контурі здійснюється контроль і регулювання температури пари, яка має значення 105 °С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням в архіві.

Регулювання температури не передбачається, датчик розташований «по місцю».

У 4 контурі необхідно контролювати та регулювати температуру пари, яка має значення 120 °С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням в архіві.

Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни витрати пари.

Вимірювання температури середовища відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, датчик розташований «по місцю».

У 5 контурі необхідно контролювати і управляти швидкістю обертання розпилюючого пристрою зі значенням 15 000 об/хв. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням в архіві.

Управління здійснюється дистанційно за рахунок пуск/стоп двигуна, датчик розташований «по місцю».

У 6 контурі необхідно контролювати та регулювати швидкість подачі повітря зі значенням 2000 м³/год. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням в архіві.

Регулювання швидкістю подачі повітря передбачається здійснювати за допомогою впливу на подачу повітря [87].

Специфікація приладів

№ прикладу	№ позиції за схемою	Параметр	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5	6
1	1а	Рівень рідини в апараті	Магнітностракційний поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-4000мм, густина 0,7кг/дм ³ , максимальна допустима температура +70 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G2, аналоговий вихід	NMT	Kobold
	1б		Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	1в		Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
2	2а	Стан насосу	Пускач магнітний. Робоча напруга 220 В.	ПМЕ 111	Lovato
3	3а	Температура теплоносія на вході в камеру	Скляний рідинний термометр, вібростійкий, робоче середовище керосин, діапазон вимірювань: 0...200 ⁰ С, під'єднання G1/2, клас точності 1,0	СП-В	ПАО „Склоприбор”, Україна
4	4а	Температура в камері	Скляний рідинний термометр, вібростійкий, робоче середовище керосин, діапазон вимірювань: 0...200 ⁰ С, під'єднання G1/2, клас точності 1,0	СП-В	ПАО „Склоприбор”, Україна
	4б		Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	4в		Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб
5	5а	Швидкість обертання розпилюючого пристрою	Частотний перетворювач	Altivar 71	“СВ Альтера” м.Київ
6	6а	Швидкість подачі повітря	Гідростатичний роторно-поршневий витратомір з аналоговим виходом, матеріал виготовлення латунь, межі в'язкості 5...100мм ² /с, діапазон вимірювань: 6-420л/год, точність 1% вимірюваної величини, максимальна допустима температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 40бар, під'єднання G1/4	DRZ	Kobold
	6б		Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713-WP	Dwyer
	6в		Мембранний виконавчий механізм прямої дії з пневматичним позиціонером, управляючий сигнал 20...100кПа, умовний хід вихідного елемента 25мм	МИМ200-113	ГідроЕнерго-Снаб

РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія одержання ϵ -полілізину включає в себе наступні стадії:

1. Доферментаційні допоміжні роботи – підготовка аераційного повітря, санітарна підготовка виробництва, приготування та стерилізація: піногасника, титрувальних агентів, підживлювальних розчинів, поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу та на виробничий біосинтез ϵ -полілізину.
2. Ферментаційний технологічний процес – одержання посівного матеріалу, біосинтез ϵ -полілізину.
3. Післяферментаційний технологічний процес – фільтрація КР, ультрафільтрація, іонообмінне виділення, знебарвлення, концентрування та сушіння.

1. Підготовка аераційного повітря. На даному етапі відбувається приготування аераційного повітря для забезпечення оптимальних умов росту мікроорганізму, на стадіях вирощування посівного матеріалу та під час виробничого біосинтезу. Рідкими відходами на даному етапі є вода яка використовується на охолодження повітря після компресора, та конденсат який утворюється під час нагрівання повітря перед головним фільтром. Воду оборотну та конденсат ми можемо використовувати на наступних етапах технологічного процесу *тому ми не враховуємо дані рідини у загальний об'єм рідких відходів.*

					НУХТ БТЕК 04.01.06 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Жолобка О.В.					
Перевір.		Скроцька О.І.					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
Розділ 10. Охорона довкілля					Літ.	Арк.	Аркушів
						105	124
					Кафедра БТМ		

2. Санітарна підготовка виробництва. В даному етапі відбувається щоденне і генеральне прибирання приміщень із застосуванням миючих засобів «Каустична сода» і «Ковіцид Форте». Після обробки відпрацьовані миючі засоби направляють до каналізації. Миття обладнання відбувається циркуляційним способом з використанням засобу «Біомой». Отже, передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

3. Приготування та стерилізація піногасника. Даний етап передбачає стерилізацію попередньо закупленого піногасника «204», в автоклаві, подача піногасника буде відбуватися тільки на стадію виробничого біосинтезу (ВБ), через наявність піноутворюючого компонента в поживному середовищі на ВБ. *Відходи піногасника не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.*

4. Приготування та стерилізація титрувальних агентів. На цьому етапі відбувається приготування 6 % розчину хлоридної кислоти для зниження рівня рН до 4, перед стерилізацією композиції з солями, та приготування 6 % розчину гідроксиду натрію для доведення рівня рН до оптимального, а саме до 7, перед внесенням посівного матеріалу. Рідкими відходами на даному етапі можуть бути титрувальні розчини які не відповідають нормативним показникам та не задовільняють рівень асептики. *Відходи титрувальних агентів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.*

5. Приготування та стерилізація підживлювальних розчинів.

Відбувається приготування підживлювальних розчинів глюкози та амоній сульфату, для дробного внесення під час ВБ. Існує можливість невідповідності сировини заявленим нормам, та невідповідність нормам асептики, при першому і другому варіанті ми можемо їх усунути, довівши або зменшивши концентрацію речовини в реакторі і провівши повторну стерилізацію, відповідно. На даному етапі відходами являються тверді речовини які представлені пакувальним матеріалом від сировини. *Відходи твердих речовин після приготування поживних середовищ не враховуємо у загальному об'ємі твердих відходів, бо ми їх будемо відправляти в пункт здачі вторсировини.*

6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу та на виробничий біосинтез. На даному етапі відходами являються тверді речовини які представлені пакувальним матеріалом від сировини. *Відходи твердих речовин після приготування поживних середовищ не враховуємо у загальному об'ємі твердих відходів, бо ми їх будемо відправляти в пункт здачі вторсировини.*

7. Підготовка посівного матеріалу. Відбувається накопичення посівного матеріалу в посівних апаратах. Посівний матеріал для засіву ферментера використовується повною мірою тому відходи від посівного матеріалу не враховуємо.

Під час вирощування посівного матеріалу відбувається великий вихід відпрацьованого повітря, так як *Streptomyces albulus* LS-84 є аеробом і для кращого накопичення біомаси йому необхідно аерація 1л/(л×хв). *S. albulus* LS-84 є спороутворювальною бактерією, тому відпрацьоване повітря на виході буде містити бактеріальні спори. *Отже передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

8. Виробничий біосинтез. На даному етапі відбувається накопичення КР, з подальшим переміщенням в збірник КР, рідкі відходів на даному етапі не враховуємо, через накопичення ϵ -полілізину в КР, яку ми в подальшому будемо використовувати на післяферментаційних стадіях технологічного процесу.

Як зазначалось вище на даному етапі відпрацьоване повітря буде забруднене спорами бактерій, отже передбачаємо, *що даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

9. Фільтрація КР. На даному етапі відбувається флокулювання культуральної рідини додаванням порошкоподібного натрій поліакрилату з наступним фільтруванням і збиранням профільтрованої рідини на наступні стадії очищення. Під час фільтруванням виділяється велика кількість міцелію, який відносимо до твердих відходів. *Отже передбачаємо, що даний етап є місцем емісії великих об'ємів твердих відходів.*

10. Доочищення фільтрату. Ультрафільтраційна мембранна система використовується для видалення водорозчинних високомолекулярних домішок, які знаходяться в профільтрованій культуральній рідині. В процесі ультрафільтрації залишається велика кількість ультраконцентрату, який ми відносимо до рідких відходів. Отже передбачаємо, *що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

11. Іонообмінне виділення.

Пермеат після ультрафільтрації надходить в іонообмінну колону для адсорбції ϵ -полілізину на катіонообмінній смолі, потім для видалення домішок використовують деіонізовану воду в великих об'ємах, а для десорбції використовують 0,25 М розчин HCl, елюат який отримують направляють на наступну стадію очищення. На даному етапі виділяється промивна вода в значних об'ємах, тому *передбачаємо що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

12. Знебарвлення.

Елюат з попередньої стадії направляють в другу іонообмінну колону, яка заповнена макропористою смолою, через яку розчин проходить і на смолі затримуються пігменти. На виході ми отримуємо знебарвлений розчин який в подальшому направляємо на концентрування. В процесі знебарвлення не утворюється відходів, тому ми *не враховуємо у загальному об'ємі відходів даний етап.*

13. Концентрування.

Безбарвна рідина, отримана на стадії знебарвлення, надходить на ультрафільтраційну установку де відбувається відсікання молекулярної маси менше 1 кДа, а саме відбувається відділення великої кількості елюенту який використовувався на стадії іонообмінного виділення. На даному етапі відбувається виділення великої кількості пермеату, тому передбачаємо, *що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

14. Сушіння.

Концентрат, отриманий на попередній стадії, сушать розпилювальною сушаркою, до вмісту сухих речовин в готовому продукті не менше 95%. В процесі сушіння відбувається виділення великої кількості відпрацьованого повітря, який містить аерозоль з механічними частками сухого ϵ -полілізину. Тому передбачаємо, що даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.

15. Пакування та маркування.

Заключною стадією виробництва ϵ -полілізину, це пакування порошкоподібної форми в поліетиленові пакети по 100 г. В процесі пакування відходи майже не виділяються, тому *відходи на даній стадії не враховуємо у загальному об'ємі відходів.*

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

В процесі виділення та очищення відбувається виділення великої кількості рідких відходів, а саме: ультраконцентрат на етапі доочищення фільтрату приблизно 3 м³; промивна вода на етапі іонообмінного виділення за 1 виробничий цикл виділяється 15 м³, та після концентрування відбувається виділення великих об'ємів пермеату приблизно 13 м³.

Таблиця 10.1.

Характеристика рідких відходів у виробництві ϵ -полілізину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
Ультраконцентрат	-	3 000	IV
Промивна вода	-	15 000	IV
Пермеат	-	13 000	IV
Приблизний об'єм приймемо:		31 000 л	

Стічні води можна очищувати наступним способом [88]:

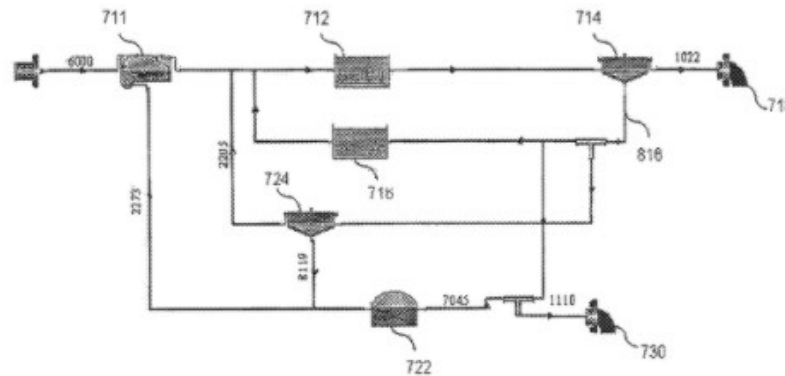


Рис 10.1. Схематичне зображення очищення стічних вод.

Стічні води надходять до первинного освітлювача (711), де розділяються на два потоки – з низьким вмістом твердих частинок і з високим. Потік з малою кількістю частинок прямує до біосорбційного тенка (712), де змішується з активним мулом, після чого утворена суміш надходить на сепаратор (714) для відділення води (яка в подальшому проходить через мембранний біореактор 718) від активного мулу, що розділяється на два потоки: менша частина йде в аеротенк (716) і потім повертається в біосорбційний тенк 712 (таким чином забезпечується часткова рециркуляція активного мулу); більша частина прямує до згущувача мулу (724) для концентрування останнього. Сконцентрований активний мул надходить в анаеробний дайджестер (722), куди також спрямовуються концентровані води від освітлювача 711. Далі вода з активним мулом частково рециркулює в аеротенк 716, а частина активного мулу видаляється (730). В анаеробному дайджестері також відбувається синтез метану, який можна використати на потреби виробництва як джерело енергії.

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Твердими відходами даного технологічного процесу є пакувальна тара та міцелій після фільтрування культуральної рідини. Пакувальну тару в розрахунок об'ємів твердих відходів не враховуємо через те що ми її сортуємо і відправляємо в пункт здачі вторсировини.

Після фільтрації культуральної рідини залишається міцелій у кількості:
 $(5\ 184 \times 41,2) / 0,2 = 1\ 423,9$ кг.

Характеристика твердих відходів у виробництві ε-полілізину

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Міцеліальна маса	Біомаса культури <i>Streptomyces albulus</i> LS-84	1 423,9	IV
Приблизний об'єм приймемо:		1 424 кг	

Утилізація твердих відходів.

Прийнявши до уваги що приблизний об'єм твердих відходів складає майже 1,5 м³, і це волога біомаса, можна зазначити що необхідність в зменшенні кількості твердих відходів відсутня. Міцеліальні відходи можна використовувати в якості компосту, біомаса *Streptomyces albulus* LS-84 має IV клас небезпеки тому вона нешкідлива для навколишнього середовища.

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**Розрахунок об'ємів відходів.**

Газоподібні відходи утворюються на наступних етапах: підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез та сушіння ε-полілізину. Газоподібні відходи в своєму складі мають аерозоль бактеріальних спор та вуглекислий газ.

Процес отримання посівного матеріалу відбувається 24 год, а виробничий біосинтез – 196 год. Аерація відбувається попередньо підготовленим стерильним повітрям зі швидкістю 1 л/хв. Процес отримання посівного матеріалу відбувається в 3 інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л та 1 000 л. Виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 10 м³.

Об'єм відпрацьованого повітря в 10 л інокуляторі:

$$5,94 \text{ л культуральної рідини} \times 1 \text{ л/(л}\times\text{хв)} \times 24 \text{ год} \times 60 = 8\,554 \text{ л}$$

Об'єм відпрацьованого повітря в 100 л інокуляторі:

$$58,77 \text{ л культуральної рідини} \times 1 \text{ л/(л}\times\text{хв)} \times 24 \text{ год} \times 60 = 84\,629 \text{ л}$$

Об'єм відпрацьованого повітря в 1 000 л інокуляторі:

$$581,81 \text{ л культуральної рідини} \times 1 \text{ л/(л}\times\text{хв)} \times 24 \text{ год} \times 60 = 837\,806 \text{ л}$$

Об'єм відпрацьованого повітря в 10 м³ ферментері:

$5\,759,8 \text{ л культуральної рідини} \times 1 \text{ л/(л}\times\text{хв)} \times 196 \text{ год} \times 60 = 67\,735\,248 \text{ л}$

Отже загальний об'єм відпрацьованого повітря буде 68 666 237 л прийємо 68 666 м³.

Сушіння відбувається за допомогою розпилювальної сушарки з продуктивністю 0,5 м³/год з втратою сушильного агента 0,4 л/с. Тривалість сушіння 1 480 л розчину з ϵ -полілізіном складе приблизно 3 год. Отже об'єм відпрацьованого повітря становить $3 \times 60 \times (0,4 \times 60) = 4\,320 \text{ л}$.

Так як продуцент ϵ -полілізіну та сам ϵ -ПЛ належить до класу безпеки BLS-1, то газоподібні відходи матимуть клас небезпеки – IV. Узагальнена характеристика газоподібних відходів наведена у таблиці 10.3.

Таблиця 10.3.

Характеристика газоподібних відходів у виробництві ϵ -полілізіну

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ, аерозоль бактеріальних спор	68 666 м ³	IV
Відпрацьоване повітря після сушіння	Аерозоль механічних часток від сухого ϵ -ПЛ	4 320 л	IV
Приблизний об'єм прийємо:		68 671 м³	

Відпрацьоване повітря можна очищувати за допомогою очищувача повітря з використанням ультрафіолетовим променів (зображення на рис 10.2.) [89], який працює наступним способом:

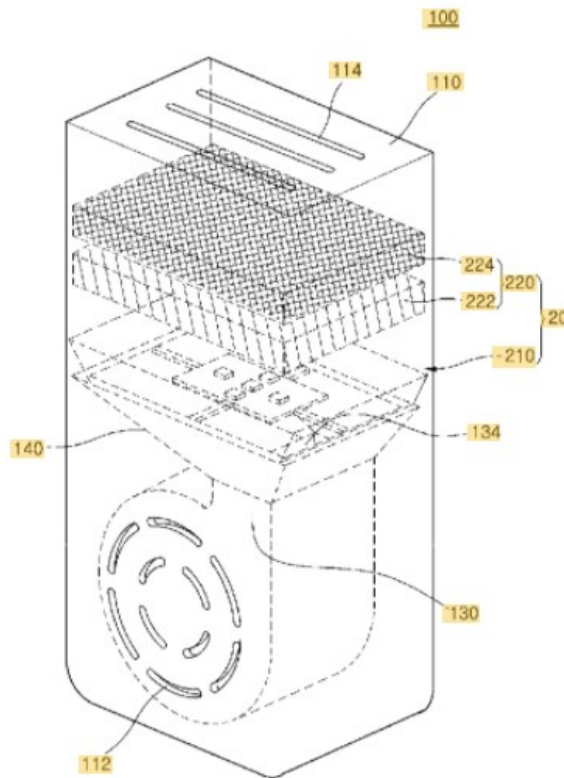


Рис.10.2. Очищувача повітря з використанням ультрафіолетовим променів

Повітря надходить через вхід 112 за допомогою вентилятора 130 в камеру очищення 20 (складається з джерела УФ-променів 210 і фільтрувального відділу 220, до складу якого входять фотокаталізатор 222 і власне фільтр 224), де піддається впливу УФ-випромінювання, після чого потрапляє на фотокаталізатор 222 (складається з оксидів титану, цинку, вольфраму) для того, щоб електрони (індуковані УФ-променями) на його поверхні прореагували з киснем, утворивши пероксиди для розкладання органічних сполук (до вуглекислого газу та води) і знищення клітин мікроорганізмів. Після каталізатора повітря проходить через фільтр 224, де вилучаються залишки зруйнованих клітин, і виходить через отвори 114 в атмосферу.

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Що б зменшити об'єм відпрацьованого миючого засобу можна замість циркуляційного методу мийки обладнань використовувати СІР-мийку, яка може використовувати повторно використаний миючий засіб після його фільтрування.

Список використаної літератури

1. Hu W., Ying M., Zhang S., Wang J. Poly(amino acid)- based carrier for drug delivery systems. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2018, 14(8): 1359-1374. doi: 10.1166/jbn.2018.2590.
2. Dominguez-Berrocal L., Murguia J. R., Marcos M. D., Martinez-Manez R., Bravo J. ϵ -Polylysine-capped mesoporous silica nanoparticles as carrier of the C9h peptide to induce apoptosis in cancer cells. *Chemistry*. 2018, 24(8): 1890-1897. doi: 10.1002/chem.201704161.
3. Shi C., He Y., Feng X., Fu D. ϵ -Polylysine and next-generation dendrigraft poly-L-lysine: chemistry, activity, and applications in biopharmaceuticals. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2015, 26(18): 1343-1356. doi: 10.1080/09205063.2015.1095023.
4. Xu Z., Feng X., Xu D., Liang J., Xu H. Recent advances in the biotechnological production of microbial poly(ϵ -l-lysine) and understanding of its biosynthetic mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(15): 6619–6630. doi: 10.1007/s00253-016-7677-36.
5. Pandey A.K., Kumar A. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-l-lysine. *Process Biochemistry*. 2014, 49(3): 496-505. doi: 10.1016/j.procbio.2013.12.009.
6. Xu D., Yao H., Cao C., Xu Z., Li S. Enhancement of ϵ -poly-l-lysine production by overexpressing the ammonium transporter gene in *Streptomyces albulus* PD-1. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2018, 41(9): 1337–1345. doi: 10.1007/s00449-018-1961-9.
7. Chen X.S., Wang K.F., Zheng G.C., Gao Y., Mao Z.G. Preparation, characterization and antimicrobial activity of ϵ -poly- l -lysine with short chain length produced from glycerol by *Streptomyces albulus*. *Process Biochemistry*. 2018, 68: 22–29. doi: 10.1016/j.procbio.2018.03.001.
8. Guo F., Zheng H., Cheng Y., Song S., Zheng Z., Jia S. Medium optimization for ϵ -poly-L-lysine production by *Streptomyces diastatochromogenes*

using response surface methodology. *Letters in Applied Microbiology*. 2018, 66(2): 124–131. doi: 10.1111/lam.12812.

9. Bhattacharya S., Dubey S., Singh P., Shrivastava A., Mishra S. Biodegradable Polymeric Substances Produced by a Marine Bacterium from a Surplus Stream of the Biodiesel Industry. *Bioengineering*. 2016, 3(4): 34. doi: 10.3390/bioengineering3040034.

10. Shu Li, Nan Wang, Zong-Jun Du, Guan-Jun Chen. Intergeneric Hybridization between *Streptomyces albulus* and *Bacillus subtilis* Facilitates Production of ϵ -Poly-L-lysine from Corn Starch Residues. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2018, 23: 580-587. doi: 10.1007/s12257-018-0253-1.

11. Keith F. Chater. Morphological and Physiological Differentiation in *Streptomyces*. *Microbial development*. 1984 – 16, 89–115.

12. Shoji Shima, Heiichi Sakai. Poly-l-lysine Produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and Fermentation Studies. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1981, 45(11): 2497-2502. doi: 10.1080/00021369.1981.10864929.

13. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с., ил.

14. Liu, K., Zhou, X., & Fu, M. Inhibiting effects of epsilon-poly-lysine (ϵ -PL) on *Penicillium digitatum* and its involved mechanism. *Postharvest Biology and Technology*. 2017, 123, 94–101. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.08.015

15. Jiao, W., Liu, X., Chen, Q. Epsilon-poly-l-lysine (ϵ -PL) exhibits antifungal activity in vivo and in vitro against *Botrytis cinerea* and mechanism involved. *Postharvest Biology and Technology*. 2020, 168, 111270. doi:10.1016/j.postharvbio.2020.111270

16. Macarisin, D., Cohen, L., Eick. *Penicillium digitatum* Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue During Infection of Citrus Fruit. *Phytopathology*. 2007, 97(11), 1491–1500. doi:10.1094/phyto-97-11-1491

17. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://agro-yug.com.ua/archives/21304>

18. Chheda, A.H., Vernekar, M.R. A natural preservative ϵ -poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry. *International Food Research Journal*. 2015, 22(1): 23-30.
19. Liu, H., Pei, H. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis*. *Food Control*. 2015, 47, 444–450. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.050
20. Tuersuntuoheti, T., Wang, Z. Review of the application of ϵ -poly-L-lysine in improving food quality and preservation. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2019, 1-14. doi:10.1111/jfpp.14153
21. Rajapaksha, D. S. W., Kodithuwakku. Evaluation of potassium sorbate and ϵ -polylysine for their inhibitory activity on post-acidification of set yoghurt under cold storage for 20 days. *Journal of Chitin and Chitosan Science*. 2013, 2, 16–20.
22. Lin, L., Gu, Y., Li, C., Vittayapadung, S., & Cui, H. Antibacterial mechanism of ϵ -poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese. *Food Control*. 2018, 91, 76–84. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.03.025
23. Обзор рыбного рынка Украины за 2019 год [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://uifsa.ua/news/news-of-ukraine/overview-of-the-fish-market-of-ukraine-in-2019>
24. Виробництво окремих видів промислової продукції за 2011–2019 роки [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2006/pr/prm_ric/xls/vppv_2011_2019.xls
25. Shu Li, Nan Wang, Zong-Jun Du, Guan-Jun Chen. Intergeneric Hybridization between *Streptomyces albulus* and *Bacillus subtilis* Facilitates Production of ϵ -Poly-L-lysine from Corn Starch Residues. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2018, 23: 580-587. doi: 10.1007/s12257-018-0253-1
26. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/>
27. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного

контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001. – № 502.

28. Antifoams [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antifoams.html>

29. Pat. US10669309B2. Method for extracting epsilon-polylysine and its hydrochloride salt from fermentation broth / Chen X., Mao Zh., Zhang J. et al. Publ. 02.06.2020. <https://patents.google.com/patent/US10669309B2/en?scholar>.

30. Chen X.S., Gao Y., Zhen B. Separation and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth. *Process Biochemistry*. 2016 – 51(1), 134–141. doi:10.1016/j.procbio.2015.11.010

31. Карлаш Ю. В., Омельчук Є. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю. В. Карлаш, Є. О. Омельчук. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

32. Волков В. А. Коллоидная химия. Поверхностные явления и дисперсные системы. СПб: Лань, 2015. — 660 с.

33. Кузнецов В. В. Физическая и коллоидная химия. М.: Высшая школа, 1968. — 392 с.

34. Кругляков П. М., Хаскова Т. Н. Физическая и коллоидная химия. М.: Высшая школа, 2010. — 320 с.

35. A process of flocculation-coagulation of fermentation broths of streptomyces sp. which permits direct obtainment of completely transparent liquids [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/EP0385552A1/en>

36. Кассеты Sartocon PESU для ультрафильтрации [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%D1%8F->

[%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F-crossflow/%D0%BA%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B5%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D1%8B-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%B9-%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8/%D0%BA%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B5%D1%82%D1%8B-sartocon-pesu-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8.html](http://www.vagonmash.ru/products/water/preparing/5/)

37. Ультрафильтрационные установки серии ТСВ-УФС [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.vagonmash.ru/products/water/preparing/5/>

38. Chen, X., Li, Q. Effect of ion form of the ion-exchange resin on ϵ -poly-l-lysine purification from microbial fermentation broth. *RSC Advances*. 2019 – 9(21), 12174–12181. doi:10.1039/c9ra00493a

39. Ion Exchange Resins: Classification and Properties [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/Brochure/al_pp_ionx.pdf

40. Zhen, B., Chen, X. An alternative method for the decoloration of ϵ -poly-l-lysine eluate by macroporous resin in the separation and purification of ϵ -poly-l-lysine from fermentation broth. *Food and Bioproducts Processing*. 2015 – 95, 332–338. doi:10.1016/j.fbp.2014.10.006

41. Particle Analysis and Sizing of Pigment Samples [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=20205>

42. Yoshida, T., Nagasawa, T. ϵ -Poly-l-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003 – 62(1), 21–26. doi:10.1007/s00253-003-1312-9

43. Вертикальный фасовочно-упаковочный автомат «ПИТПАК» [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://taurasfenix.com/oborudovanie/dlya-fasovki-sypuchikh-produktov/pitpak/>

44. Фильтр воздушный для вентиляции панельный (ФВП, ФЯП, ВП) грубой очистки G2, G3, G4, G5 из хим волокна [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-voлокna/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki

45. Винтовой компрессор Comprag F-3710 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.compressortyt.ru/stanciya/kompr/vintovye/comprag/f-3710/>

46.осушитель rdx-65 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://kms-market.com.ua/p504451339-osushitel-rdx.html>

47. Ресивер для компрессора на 6000 литров 8 бар вертикальный [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://drobesfera.ru/product/resiver-dlya-kompressora-na-6000-litrov-8-bar-vertikalnyy>

48. Водяной канальный нагреватель AVS 160 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.realvent.ru/catalog/ventilyaciya/teploobmenniki/vodnyaye-nagrevateli/salda/avs-160-71372/>

49. Фильтр воздушный карманный ФВК (ФяК) тонкой очистки F5-F9 на ленте [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/tonkoj-ochistki/klass-f9-eu9/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-tonkoj-ochistki-f5-f9-na-lente/>

50. Фильтр воздушный абсолютной очистки НЕРА МКР: класс очистки H11, H13, H14, цена, фото, характеристики [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr_vozdushnyj_absolyutnoj_ochistki_hepa_mkr_klass_ochistki_h11_h13_h14/

51. Ферментеры из нержавеющей стали с механической мешалкой от 10 до 1000 литров и более [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyishlennyye\)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(-kitaj\)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bolee.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyye)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(-kitaj)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bolee.html)

52. Перистальтический насос Dynamik [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://logrus.ua/ru/peristaltic-pump-dynamik/>

53. ДОЗАТОР СИПУЧИХ МАТЕРІАЛІВ 0,6 КУБ. М [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source=google&utm_medium=cpc&keyword=%2B%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%2B%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkoL7YZVDQaZBCjZ1cSRCfVLsszsHp3nzLIc2GiFSTHO FqvEJb6ny6RoCBKAQAvD_BwE

54. Аппараты стальные эмалированные с механическим перемешивающим устройством [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php

55. Реактор лабораторный [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php

56. Реактор-ферментер РФ-100 для биологических препаратов [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/>

57. Ваговий дозатор ДВМ-50 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://foodbay.com/uk/minsk/search/upakovochnoje-oborudovanije/fasovochno-upakovochnyje-avtomaty/dozatory/vesovoj-dozator-dvm-50-23714.html>

58. Перистальтические насосы - МРС [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.kolossal.com.ua/index.php?page=production&id=17&sid=47>

59. Реактор с мешалкой 50 л [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/reaktor-s-meshalkoy-50-l/>
60. Циркуляційний Насос Насосы+ BPS 25-4ESA-180, приєднувальний комплект (А) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://f.ua/ua/nasosiy/bps-25-4esa-180.html>
61. Промышленный ферментер 1000-2000 л [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/fermentyery/promyshlenny-fermenter-biotechno-obemom-1000-2000-l/>
62. Дозатор весовой автоматический для дозирования воды. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz5.html>
63. Реакторы химические с перемешивающим устройством [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php
64. Циркуляційний Насос Насосы+ BPS 32/12-220 + гайка [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://f.ua/ua/nasosiy/bps-32-12-220-043-gayka-up-4.html>
65. Стерилизационные системы непрерывного действия [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/>
66. Дозатор весовой автоматический для дозирования щебня. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz3.html>
67. Аппараты с механическими перемешивающими устройствами [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://chimmash.ru/meshalka.htm>
68. МОДЕЛЬНЫЙ РЯД ПЕРИСТАЛЬТИЧЕСКИХ НАСОСОВ MS [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://vaterpass.ua/modelnyj_ryad_peristalticheskikh_nasosov_ms
69. Перистальтические насосы МР [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.kolossal.com.ua/index.php?page=production&id=17&sid=46>

70. Сборники стальные эмалированные без рубашки вертикальные [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/sborniki_emal_ru.php

71. Мембранный дозирующий насос HC899 [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.vicaqua.com.ua/ru/catalog/dosing_pumps/hc899/

72. Відцентровий насос JET150S PRIME [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://storgom.ua/product/nasos-centrobezhnyy-optima-cpm-200-1-5kvt-19725.html>

73. Промышленные фильтр-прессы ЧМ [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.npk-vu.com.ua/images/stories/Catalog2012.pdf>

74. Насос центробежный Optima JET150S PRIME 1,3кВт [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://storgom.ua/product/nasos-centrobezhnyy-optima-jet150s-prime-1-3kvt-17246.html>

75. Дозирующий насос DRP-18 [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.vicaqua.com.ua/ru/catalog/piston_pumps/drp-18/

76. Насос центробежный [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://sigma.ua/buy/nasos-tsentrobeznyy-1-1kvt-hmax-20m-qmax-300l-min-nerzh-leo-3-0-775520/?gclid=cj0kcqjwwlkfbhdparisapzpi-jhpex_9ayz91vecxh1w3dwdna7z6p0y9yhzdbx1d1ecnc8fksqm5iaarpsyualw_wcb

77. ИОНООБМЕННЫЕ КОЛОННЫ [Электронный ресурс] // Режим доступа: [http://www.sverd.ru/products-and-services/oborudovanie/oborudovanie-dlya-opresneniya-solenyix-vod,-obessolivaniya-lyubyix-vod,-vodopodgotovki-dlya-teplosetej,-kondiczionirovanie-vodyi/ionoobmennyye-kolonny-\(filtryi\).html](http://www.sverd.ru/products-and-services/oborudovanie/oborudovanie-dlya-opresneniya-solenyix-vod,-obessolivaniya-lyubyix-vod,-vodopodgotovki-dlya-teplosetej,-kondiczionirovanie-vodyi/ionoobmennyye-kolonny-(filtryi).html)

78. Высокоскоростная распылительная сушилка [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.diapazon-pharm.ru/vysokoskorostnaya-raspylitelnaya-sushilka>

79. Ємності з нержавіючої сталі на колесах для рідин [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://zakupka.com/p/602706991-emkosti-iz-nerzhaveyki-na-kolesah-dlya-zhidkostey/>

80. Shoji Shima, Heiichi Sakai. Poly-l-lysine Produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and Fermentation Studies. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1981, 45(11): 2497-2502. doi: 10.1080/00021369.1981.10864929.

81. Kahar P., Iwata T., Hiraki J., Park E. Y., Okabe M. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2001, 91(2): 190–194. doi: 10.1016/s1389-1723(01)80064-5.

82. Itzhaki R. F. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*. 1972, 50(2): 569–574. doi: 10.1016/0003-2697(72)90067-x

83. Біочутливий аналізатор SBA-40C [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.biosensor1.org/supply/18.html>

84. Polley J. R. Colorimetric Determination of Nitrogen in Biological Materials. *Analytical Chemistry*. 1954, 26(9): 1523–1524. doi: 10.1021/ac60093a039.

85. SPECIFICATION OF ϵ -POLYLYSINE [Електронний ресурс] // Режим доступу:

<http://www.chihonbio.com/Documents/SPECIFICATION%20OF%20POLYLYSINE.pdf>

86. Christopher B. Elisabeth A. Isolation and Antimicrobial Potential of Epsilon Poly-L-lysine. *Worcester Polytechnic Institute*. 2008 – 56.

87. Ельперін І.В. Автоматизація та управління біотехнологічним виробництвом: Метод. рекомендації до виконання індивідуального завдання з дисципліни для студентів освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» всіх форм навчання. /Уклад: І.Ельперін – К.: НУХТ, 2017. – с.

88. Liu W., Jordan E., Smith G., Zuback E. Hybrid aerobic and anaerobic wastewater and sludge treatment systems and methods: пат. US8894855B2. Опубл. 25.11.2014.

[https://patents.google.com/patent/US8894855B2/en?q=wastewater+treatment&oq=wastewater+treatment.](https://patents.google.com/patent/US8894855B2/en?q=wastewater+treatment&oq=wastewater+treatment)

89. *Yi J., Son Y., Lee S. et al.* Air purifier using ultraviolet rays: пат. US20190030202A1. Опубл. 31.01.2019.

[https://patents.google.com/patent/US20190030202A1/en?q=scrubbers+air+cleaning&oq=scrubbers+for+air+cleaning.](https://patents.google.com/patent/US20190030202A1/en?q=scrubbers+air+cleaning&oq=scrubbers+for+air+cleaning)

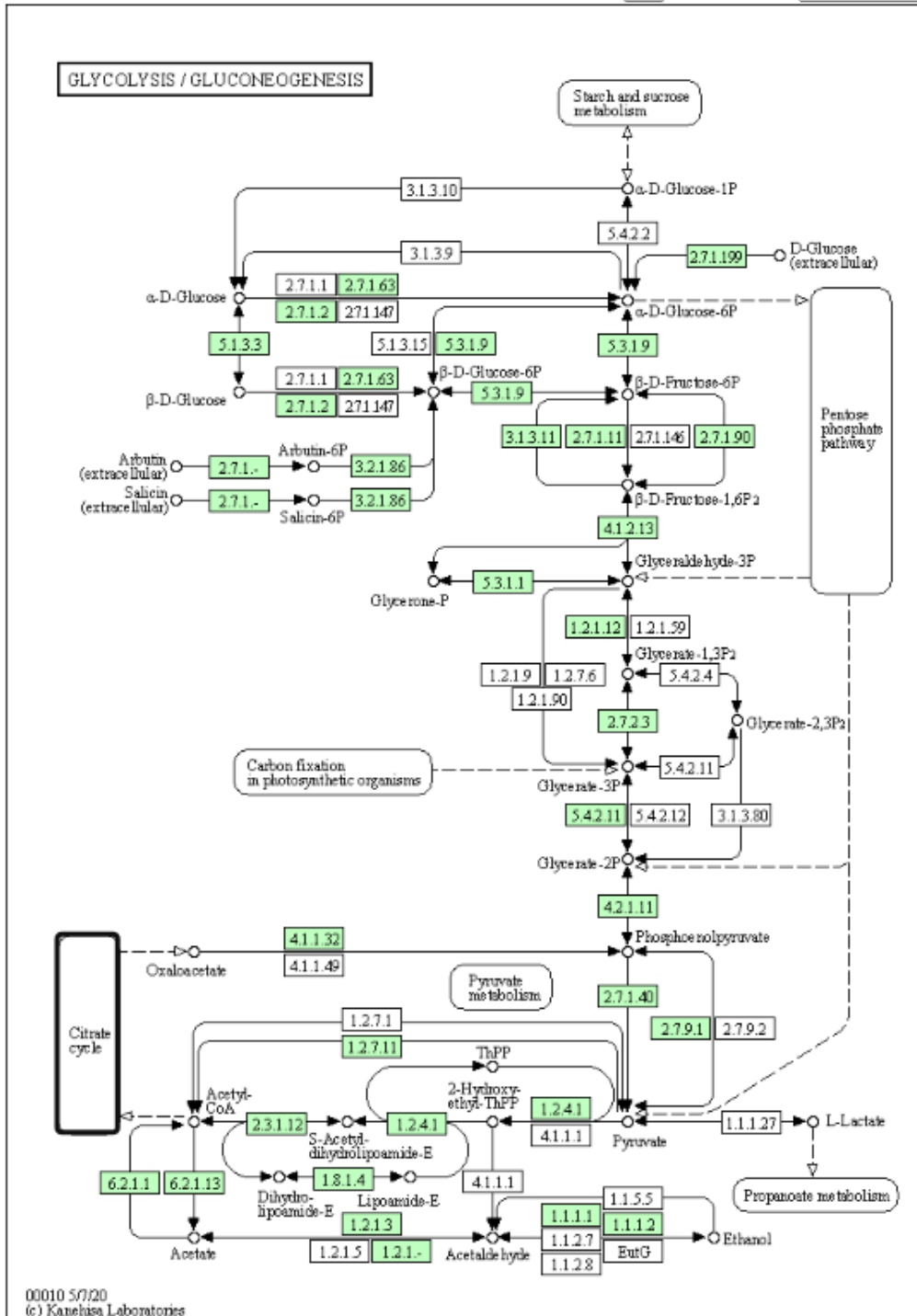
ДОДАТКИ

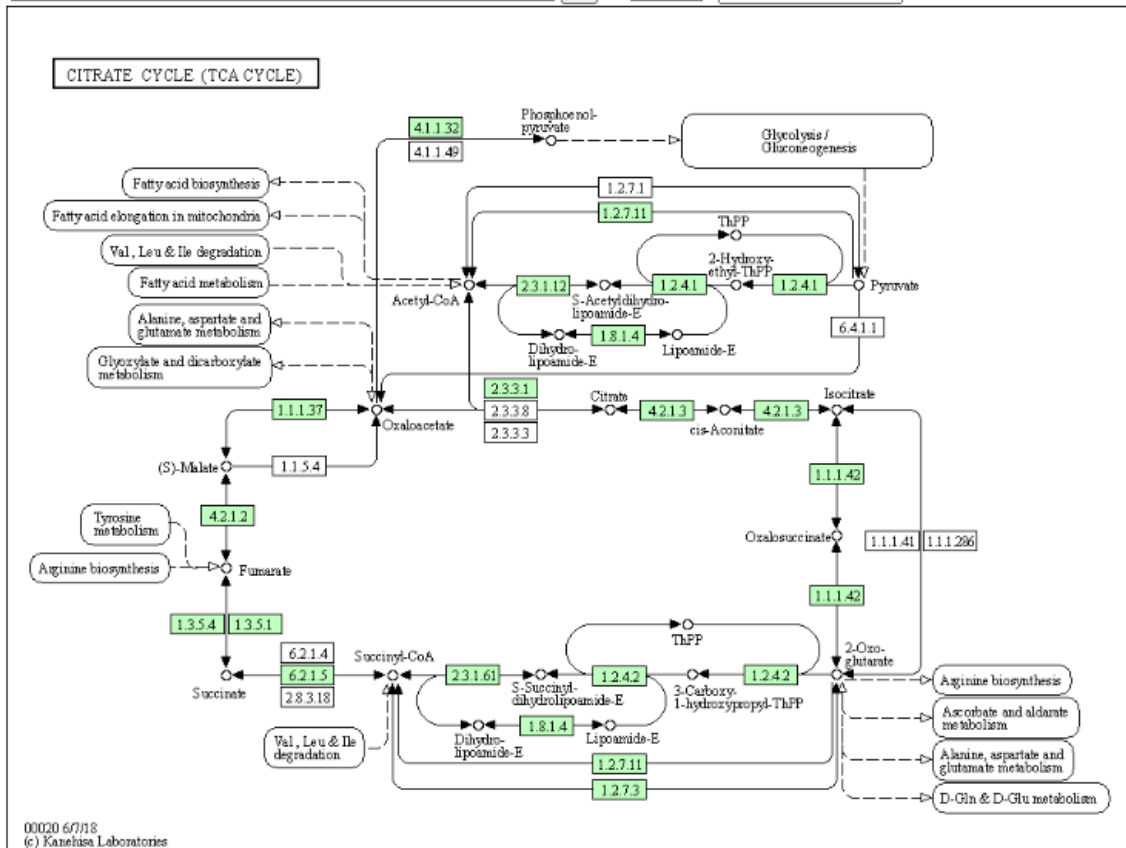


Glycolysis / Gluconeogenesis - *Streptomyces albus* NK660

[Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download KGM | Show description | User data mapping]

Reference pathway Go 100%





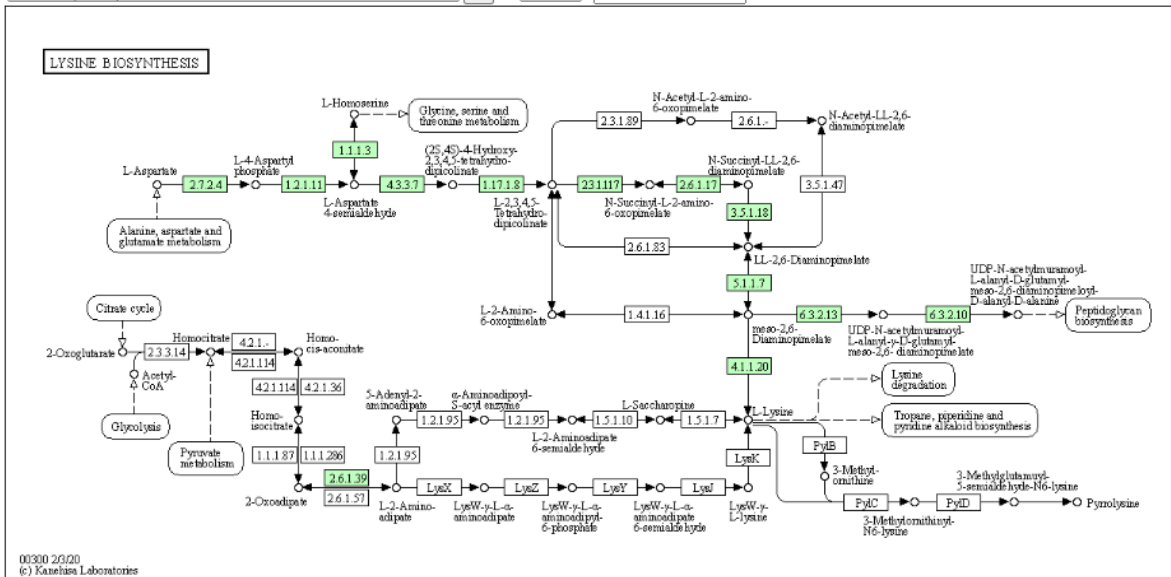
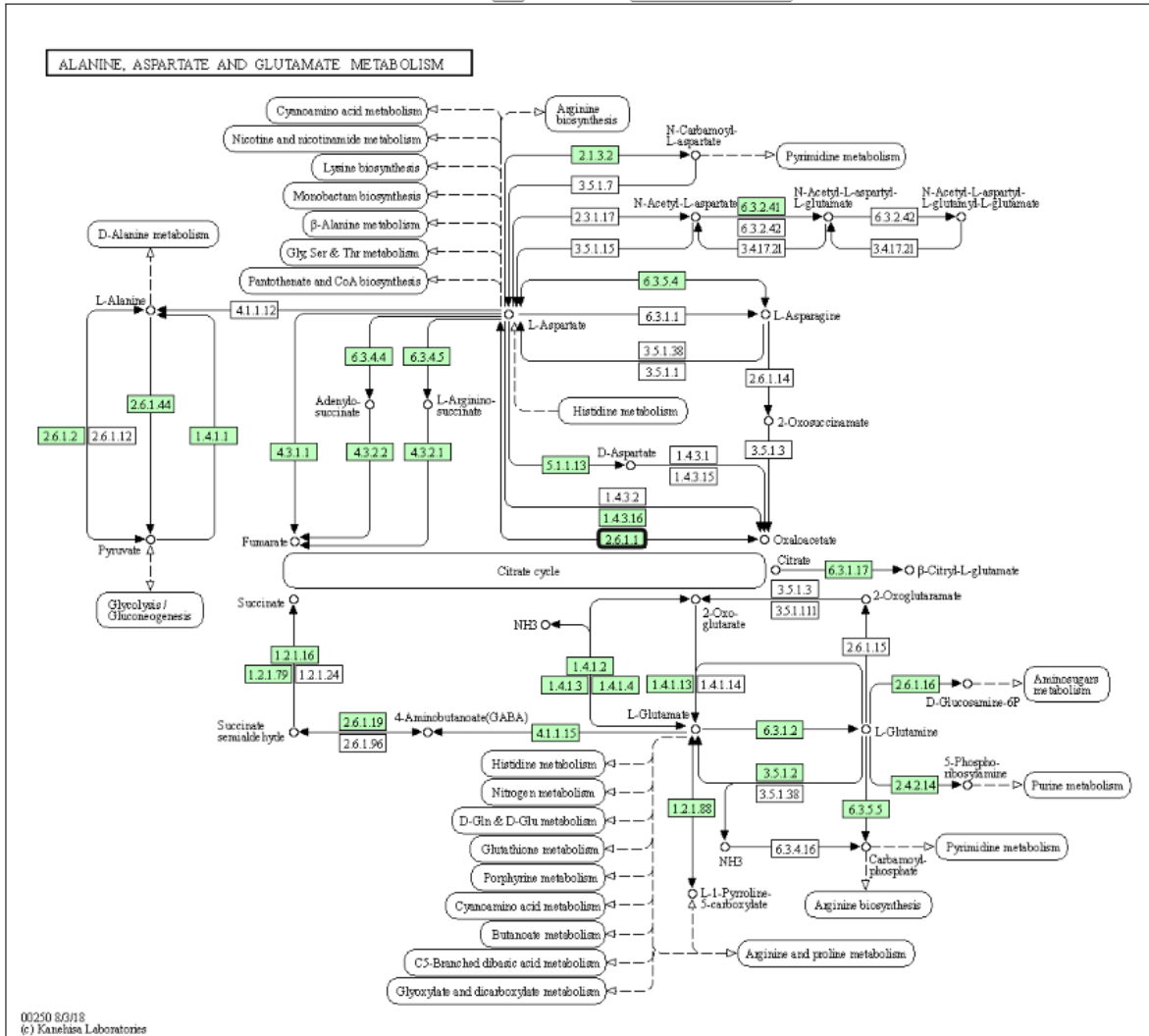
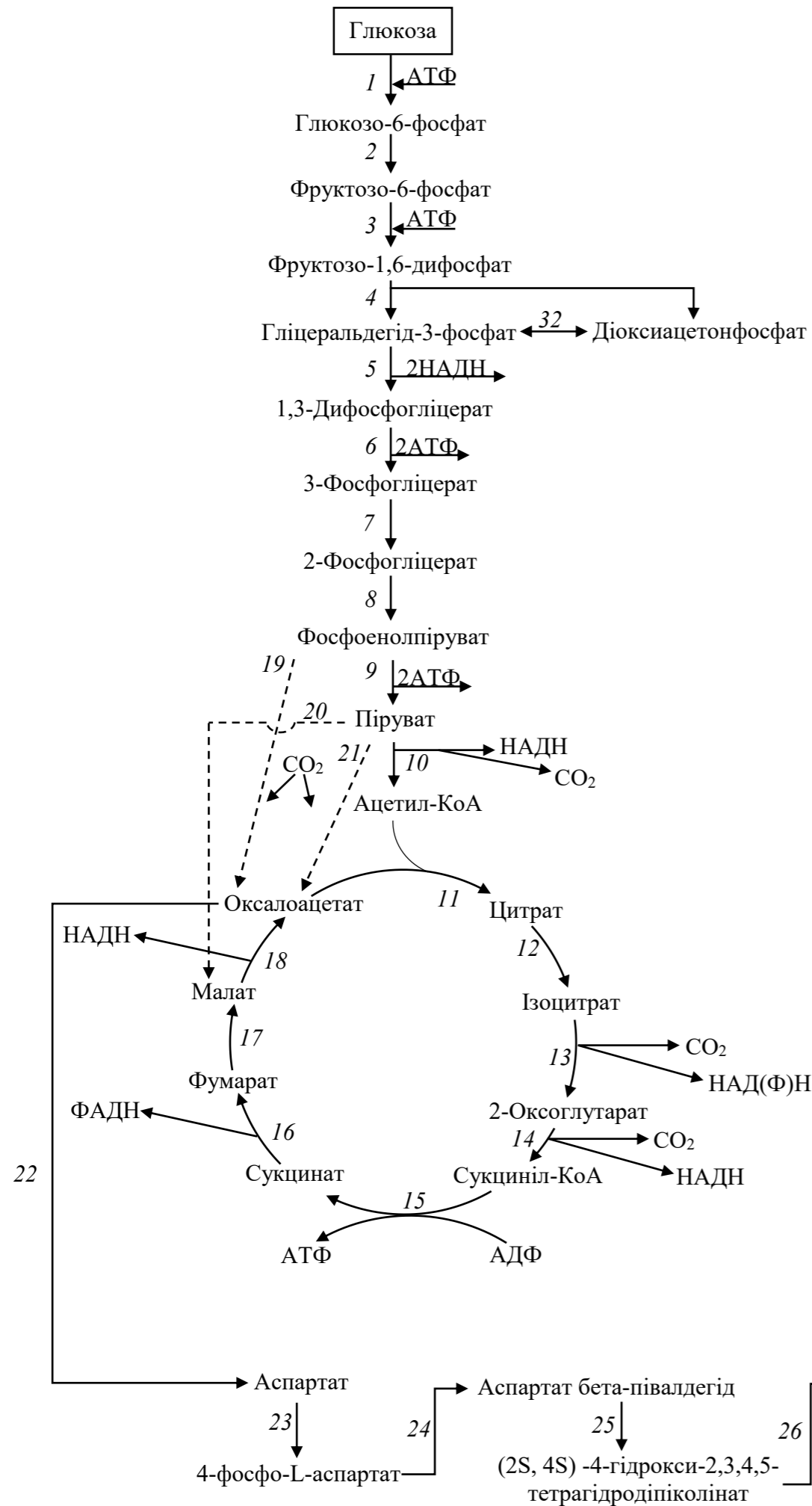
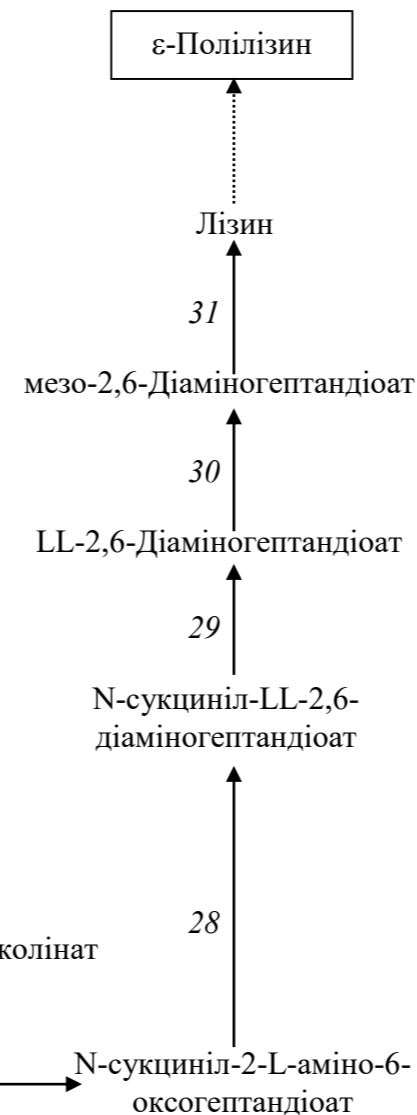


Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт



Умовні позначення: —> - основний шлях біосинтезу; - - - -> - анаплеротичні реакції.

Ферменти: 1- Глюкокіназа [КФ: 2.7.1.2]; 2- Глюкозо-6-фосфатна ізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 3- АТФ-залежна фосфоглюкокіназа [КФ: 2.7.1.11]; 4- фруктоза-бісфосфатна альдолаза, клас II [КФ: 4.1.2.13]; 5-гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 6-фосфогліцерат-кіназа [КФ: 2.7.2.3]; 7- 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератна мутаза [КФ: 5.4.2.11]; 8- енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 9- піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40]; 10-піруватдегідрогеназа 11-цитратна синтаза [КФ: 2.3.3.1]; 12- аконітат гідратаза [КФ: 4.2.1.3]; 13- ізоцитратдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.42]; 14-2-оксокислата ферредоксин оксидоредуктаза субодиниця альфа [КФ: 1.2.7.11]; 15- бета-субодиниця сукциніл-КоА синтетази [КФ: 6.2.1.5]; 16- сукцинатдегідрогеназа [КФ: 1.3.5.1]; 17-фумаратгідратаза, клас II [КФ: 4.2.1.2] 18- Малатдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.37] 19 - фосфоенолпіруват карбоксикіназа (АТФ) [КФ: 4.1.1.49]; 20 – малатдегідрогеназа (декарбоксилювання) [КФ: 1.1.1.39]; 21 – піруват карбоксилаза [КФ: 6.4.1.1]; 22- аспартатамінотрансфераза [КФ: 2.6.1.1] 23- аспартатакіназа [КФ: 2.7.2.4] 24- аспартат-напівальдегіддегідрогеназа [КФ: 1.2.1.11] 25- 4-гідрокси-тетрагідродіпіколінатна синтаза [КФ: 4.3.3.7] 26- 4-гідрокси-тетрагідродіпіколінат редуктаза [КФ: 1.17.1.8] 27- 2,3,4,5-тетрагідропіридин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинілтрансферази [КФ: 2.3.1.117] 28- N-сукцинілдіамінопімелат амінотрансфераза [КФ: 2.6.1.17] 29- сукцинілдіамінопімелатдКФцинілаза [КФ: 3.5.1.18] 30- діамінопімелатна епімераза [КФ: 5.1.1.7] 31- діамінопімелат-декарбоксилаза [КФ: 4.1.1.20] 32- тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1)



Intergeneric Hybridization between *Streptomyces albulus* and *Bacillus subtilis* Facilitates Production of ϵ -Poly-L-lysine from Corn Starch Residues

Shu Li, Nan Wang, Zong-Jun Du, and Guan-Jun Chen

Received: 18 July 2018 / Revised: 4 October 2018 / Accepted: 7 October 2018
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2018

Abstract Intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis* to produce ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) from corn starch residues (CSR) was investigated in this study. One hybrid, designated *S. albulus* LS-84, which incorporated the protease gene from *B. subtilis*, could effectively utilize the protein in CSR as a nitrogen source. In fed-batch fermentation, LS-84 produced 32.6 g/L ϵ -PL in the presence of 20 g/L CSR. This was an increase of 256.1% compared to that of the parent strain *S. albulus* LS-01. The rapid hydrolysis of CSR by protease caused rapid growth for LS-84, which allowed higher respiratory activity. As a result, activities of several key enzymes in LS-84 were higher than those in LS-01; additionally, the content of several intracellular amino acids, such as Asp, Glu, and Arg, was also much higher in LS-84. Therefore, intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis* to produce ϵ -PL from CSR is an economical method for effective utilization of waste resources.

Keywords: ϵ -poly-L-lysine, corn starch residues, intergeneric hybridization

Shu Li^{*}
College of Marine Science, Shandong University (Weihai), Weihai 264209, China
Tel: +86-06315688199; Fax: +86-06315688303
E-mail: lishu2016@sdu.edu.cn

Nan Wang
Weihai Food and Drug Administration, Testing Center, Weihai 264210, China

Zong-Jun Du, Guan-Jun Chen
College of Marine Science, Shandong University (Weihai), Weihai 264209, China

1. Introduction

ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) is a new food preservative, and is produced by *Streptomyces* [1]. Due to its highly effective bacteriostatic effect and safety for humans, ϵ -PL has become popular in the food processing industry [2]. In recent years, some researchers have focused on growth medium optimization for ϵ -PL fermentation, with the primary goal of adopting low costs for the carbon and nitrogen sources, which can then reduce the production cost. The most commonly used carbon sources in ϵ -PL production include glucose and glycerol [3-5]. Low-cost cane molasses has been reported to be used for economical production of ϵ -PL as well [6]. For a nitrogen source, expensive yeast extract and beef extract can produce a high yield of ϵ -PL [5,7]; however, the hydrolysate of *Streptomyces* cells (HSC) was recently reported as a low-cost, alternative raw material for ϵ -PL production [6].

The largest by-product generated from the glucose production process in the starch industry is corn starch residues (CSR), of which the composition is 50% insoluble protein and 45% diatomite. CSR was intended to be a high quality ingredient for animal feed, but owing to the high concentration of diatomite it is usually used as fertilizer in farmland, which is a serious waste of resources. At present, there is no economical way to isolate protein from CSR, so we hypothesized that CSR could possibly be a nitrogen source for ϵ -PL production by *S. albulus* hydrolysis. Our previous research had found that *S. albulus* prefers to directly uptake soluble nitrogen from sources such as yeast extract and beef extract. Unfortunately, we found that it could not effectively hydrolyze the insoluble protein in CSR because of the low activity of extracellular proteases,

which became the barrier for utilization of waste resources.

Bacillus subtilis is an industrial strain commonly used today to produce protease. For example, it can be used for fermentation of soybean meal. Therefore, combining protease synthesis from *B. subtilis* with *S. albulus* was possibly a new strategy for ϵ -PL production from CSR. In this research, an intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis* was investigated to verify this theory. Through protoplast fusion, one hybrid designated *S. albulus* LS-84 was selected, based on proteolytic rings. This hybrid had protease activity as high as 345.4 U/ml, which is 7.6-fold higher than the parent strain. Furthermore, *S. albulus* LS-84 produced ϵ -PL at 32.6 g/L in the presence of 20 g/L CSR in fed-batch fermentation. To our knowledge, this is the first report of ϵ -PL production from CSR by intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis*.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism and chemicals

S. albulus LS-01 was a mutant derived from an antibiotic-resistant mutation as described previously [5,8]. *B. subtilis* 310A and CSR were obtained from Xiwang Group Company (Zouping, PR China). Chemical reagents that were used for enzyme activities detection, such as lysozyme, ATP, ADP, NADH, NADP, acetyl CoA, 6-phosphate dehydrogenase, etc., were purchased from Sigma (USA) and Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd (China). All other chemicals used in this work were of analytical grade.

2.2. Medium and culture conditions

BTN solid medium was as described previously [9]. *B. subtilis* and spores of *S. albulus* were spread on BTN agar plates for incubation at 30°C for 3 days and 7 days, respectively. Regeneration medium (RM) was as described previously [10]. Protoplasts of *S. albulus* and *B. subtilis* grew on RM agar plates and generated spores after incubation for 10 days under 30°C. Spores of *S. albulus* were inoculated in M3G medium [10] and incubated at 30°C on a rotating shaker. After 24 h of incubation, fermentation broth was obtained as the seed culture. Fermentation medium was the same as M3G, but with the modification that 20 g/L of CSR replaced 5 g/L of yeast extract.

2.3. Protoplast preparation and protoplast fusion

Protoplast preparation was as described previously [10] with some modification. M3G medium was inoculated with *B. subtilis* and spores of *S. albulus*. After 24 h of incubation, cells of each strain were harvested by centrifugation at 4,000×g, and then were washed with PB buffer twice. The cell suspension was exposed to a 5 mg/ml lysozyme solution

for 1.5 h at 30°C. The protoplast formation was observed by light microscope (Sigma, USA). After there were no residual mycelia visible, protoplasts of both strains were centrifuged at 4,000×g to remove the lysozyme, and then suspended in PB buffer. For *B. subtilis*, the protoplasts were exposed to a temperature of 70°C for inactivation, and complete inactivation was verified after 30 min because there is no colony growth on RM agar plates after cultivation for 7 days. Protoplasts of *S. albulus* were maintained alive. Protoplasts of both strains were mixed together and fused by 40% aseptic PEG6000. After gentle shaking for 15 min at 40°C, the suspension of fused strains was diluted with PB buffer and amplified on RM agar plates for 10 days.

2.4. PCR amplification

The bacterial genome was extracted by a test kit (Sangon Biotech Co., Ltd.). PCR primers for 16S rDNA amplification were as follows: forward primer, 5'-CGTGCTTAACAC ATGCAAGTCGAAC-3'; reverse primer, 5'-AGCAAT GCTGATCTGCGATTACTAG-3'. The primers used for amplification of the specific protease gene in *B. subtilis* were as follows: forward primer, 5'-GGGGGATTAT GTGGGTTT-3'; reverse primer, 5'-TACAATCCGACA GCATTCCA-3'. Primers were designed according to the protease gene sequence of DQ983789 in GenBank.

2.5. Fed-batch fermentation

Fed-batch fermentation was carried out in a 5-L stirred-tank bioreactor (Shanghai Baoxing Bio-engineering Equipment Co., Ltd., China). Aseptic fermentation medium (3.2 L) was inoculated with 240 ml of seed culture. The initial pH was adjusted to 6.8 with $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. The dissolved oxygen (DO) was kept at 10% by the automatic control of the stirrer speed. The change of pH during cultivation was detected by a pH electrode, and $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solution was added automatically to maintain the pH at 3.8. The residual glucose was maintained at 10 g/L by automatically pulsed sterile glucose that was added to the culture medium by a peristaltic pump. NH_4^+ -N concentration was maintained at 0.2–0.3 g/L by the addition of an aseptic $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution at a concentration of 600 g/L.

2.6. Analytical methods

Dry cell weight (DCW) was determined by harvesting fermentation broth, filtering the mycelia and drying at 100°C for 10 h. The glucose concentration was determined by a biosensor analyzer SBA-40C (Shandong Academy of Sciences). ϵ -PL concentration was determined by the procedure described by Kahar [3]. NH_4^+ -N was analyzed by means of a colorimetric method using Nessler reagent. Respiratory activity of *S. albulus* was determined by CTC staining and viability staining [8]. Intracellular amino acid

level was determined by harvesting the culture sample, treating it in TCA solution, heating in boiling water for 30 min, and detecting with an amino acid analyzer (MembraPure GmbH). Enzyme activities of hexokinase (HK), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), aspartokinase (AK), citratesynthase (CS) and ϵ -PL synthetase (Pls) were measured according to Hamano, Murmu, Wang, etc. respectively [8,11,12].

3. Results and Discussion

3.1. Protoplast fusion and hybrids screening

Yeast extract is the best organic nitrogen source for *S. albulus* LS-01. With this source, as much as 60 g/L of ϵ -PL can be obtained using M3G medium in fed-batch fermentation [8]. However, *S. albulus* LS-01 cannot effectively hydrolyze the insoluble protein in CSR because of the low activity of extracellular proteases, so only 11.4 g/L of ϵ -PL could be obtained with CSR. *B. subtilis* 310A, which is usually used for commercial protease production, has strong hydrolysis activity on extracellular proteins. Therefore, combining protease synthesis by a *B. subtilis* gene expressed by *S. albulus* was first investigated in this study. After protoplast preparation, these two strains were fused by PEG6000. Protoplast fusion is an efficient breeding technique, which is characterized by its non-reliance on the homology of the microorganisms; therefore, recombination can be extended to interspecies or even inter-genera crossings. For example, intergeneric hybridization is possible between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* [13] or *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus amyloliquefaciens* [14].

The process of protoplast fusion can be observed by an optical microscope as shown in Fig. 1. Protoplasts first colocalize under the influence of PEG and then cell fusion gradually completes due to the fluidity of the cell membrane. Through a microscope, protoplast fusion can be clearly seen, including two-cell fusion, three-cell, and multiple-cell fusion. Among these hybridizations, protoplast fusion may occur between *S. albulus* species, or between *B. subtilis* species, or between these two genera. Because a prokaryotic microorganism has no nucleus, chromosome hybridization can be easily carried out after membrane fusion. Infrequently, fusion of the entire genomes took place, forming diploids or polyploids [13]; most often, fusion took place as a partial genetic recombination; and a few protoplasts could not be fused, forming only heterokaryons [15].

To easily distinguish the target recombinants of *S. albulus* from other hybrids based on proteolytic rings, protoplasts of *B. subtilis* were inactivated by heat; with this method, their chromosomes remain active [15] and are able to fuse

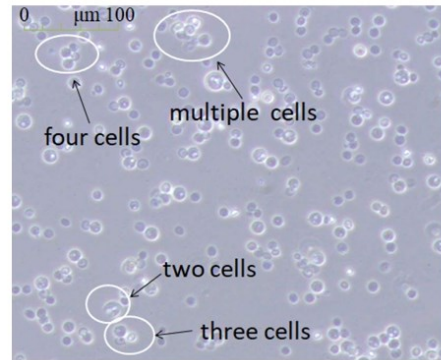


Fig. 1. Protoplast fusion between *S. albulus* and *B. subtilis* under induction of PEG600. Two-cell fusion, three-cell, four-cell, and multiple-cell fusion can be clearly seen. Photographs were obtained by a microscope.

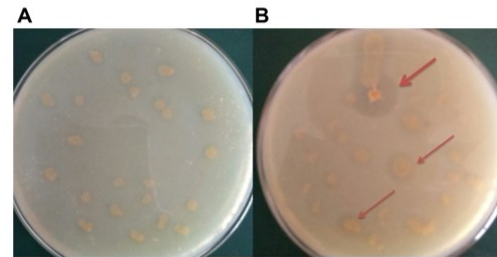


Fig. 2. *B. subtilis* protoplasts inactivated by heat were able to fuse with live ones of *S. albulus*, forming active hybrids which could secrete protease and generate proteolytic rings. A: *S. albulus* LS-01 could not generate proteolytic rings on RM plates; B: Recombinants of *S. albulus* could generate proteolytic rings on RM plates.

with live protoplasts of *S. albulus*, generating active hybrids which can secrete protease and generate proteolytic rings on RM plates (Fig. 2). By this screening method, five recombinants of *S. albulus*, with larger proteolytic rings, were selected. One hybrid, designated *S. albulus* LS-84, was shown through testing to be the strain that could most rapidly hydrolyze the protein in CSR as a nitrogen source. Furthermore, *S. albulus* LS-84 was subsequently proven to be genetically stable in eight continuous generations of subcultures (data not shown).

3.2. Specific protease gene and 16S rDNA amplification

16S rDNA sequences of recombinant *S. albulus* LS-84, *B. subtilis* 310A, and *S. albulus* LS-01 were analyzed to compare their homology by amplifying the 16S rDNA with common primers for bacteria (Fig. 3B). After genetic

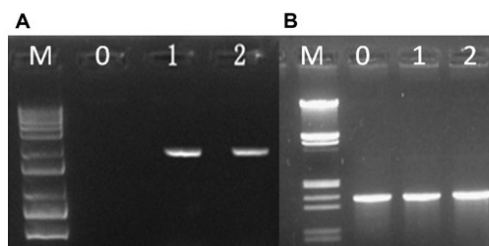


Fig. 3. PCR fingerprints of specific protease gene and 16S rDNA genes. A: fingerprints of specific protease gene; B: fingerprints of 16S rDNA genes; M: DNA Marker; 0: the parental strain *S. albulus* LS-01; 1: the recombinant *S. albulus* LS-84; 2: the parental strain *B. subtilis* 310A.

sequencing, complete 16S rDNA gene sequences of the above strains were detected as 1524 bp, 1485 bp, and 1422 bp, respectively (data not shown). Using the BLAST program in NCBI, sequence identity between *S. albulus* LS-84 and *S. albulus* LS-01 was 99.8% while between *S. albulus* LS-84 and *B. subtilis* 310A it was 75.6%. This result suggested that the recombinant *S. albulus* LS-84 essentially belongs to the *S. albulus* species. For detection of the specific protease gene from *B. subtilis*, primers were designed according to the protease gene sequence of DQ983789 in GenBank and PCR fingerprints are shown in Fig. 3A. Clearly, the recombinant *S. albulus* LS-84 was positive for the protease gene, while the parental strain *S. albulus* LS-01 was negative; this was direct evidence for successful intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis*.

3.3. Fed-batch fermentation of *S. albulus* using CSR as organic nitrogen source

To test the ϵ -PL productivity of *S. albulus* utilizing CSR as an organic nitrogen source, characterization of LS-84 and LS-01 for fed-batch fermentation was investigated in a 5-L fermentation tank, containing 20 g/L of CSR. Fig. 4 shows the time profiles of fed-batch fermentations with CSR for these two strains.

For the parent strain *S. albulus* LS-01, the activity of extracellular proteases sustained downturn during the period of fermentation and the highest activity was only 16.4 U/ml (Fig. 4A). While for the recombinant *S. albulus* LS-84, the situation was greatly improved. Protease activity was raised rapidly to 58.6 U/ml at 40 h and then improved continuously to 76.5 U/ml at 140 h, which was 4.2-fold higher than the parent strain. This result proved the success that *S. albulus* LS-84 could express the protease gene from *B. subtilis* through intergeneric hybridization. Extracellular

concentration of total amino acids (TAA) in fermentation broth was also investigated for comparison (Fig. 4B). Owing to the high protease activity of *S. albulus* LS-84, the CSR was able to be effectively degraded into amino acids and provided organic nitrogen source for normal growth of *S. albulus* LS-84. An interesting fact was that, the initial protein content in fermentation broth was 10 g/L, while TAA concentration was never more than 1.8 g/L during the fermentation period. This suggested that there was no need for *S. albulus* LS-84 to secrete enough protease to degrade all the proteins, as long as they could maintain the normal growth. Otherwise, situation of substrate inhibition may be occurred because of the excess amino acid. However, TAA concentration for *S. albulus* LS-01 was far less than LS-84 owing to its low protease activity, only 0.1–0.2 g/L. Obviously, such a low concentration of nitrogen source would affect the growth of strain.

For the parent strain, *S. albulus* LS-01, owing to the low activity of extracellular proteases, biomass growth was very slow because it lacks sufficient nutrition from CSR. Therefore, the final DCW obtained was 17.5 g/L (Fig. 4F). In fact, slow growth of the microorganism was consistent with slow glucose consumption: only 450 g of glucose was consumed in total during the fermentation period. Correlating to the growth of biomass, ϵ -PL production exhibited the same trend and reached only 11.4 g/L at the end of the fermentation (Fig. 4G). This result showed that it is not economical to produce ϵ -PL from CSR without high activity protease. For the recombinant *S. albulus* LS-84, the situation was completely different, as was our expectation. *S. albulus* LS-84 effectively utilize the protein as a nitrogen source and exhibited normal growth and metabolism compared to *S. albulus* LS-01 (Fig. 4F); this is additional evidence of intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis*. Both glucose and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ consumption were promoted in LS-84, as determined from the feeding rate. Glucose feeding started at 40 h for LS-84, which is advanced 20 h compared to LS-01 (Fig. 4D). Finally, 1150 g of glucose was consumed in total during the fermentation period, 2.55-fold greater than the control. Similarly, the amount of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ feeding in LS-84 was 196% more than LS-01 (Fig. 4E). The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ form is the most effective inorganic nitrogen source for ϵ -PL production, and can combine with oxaloacetate to generate the precursor, L-lysine [16]. Most striking was that ϵ -PL production and cell growth rates in LS-84 were also accelerated during the feeding phase of fed-batch fermentation. As a result, ϵ -PL production and biomass reached 32.6 g/L and 41.2 g/L respectively at 196 h, which was an increase of 185.6% and 135.8%, respectively, compared to the control (Fig. 4G). This result showed that, through intergeneric hybridization

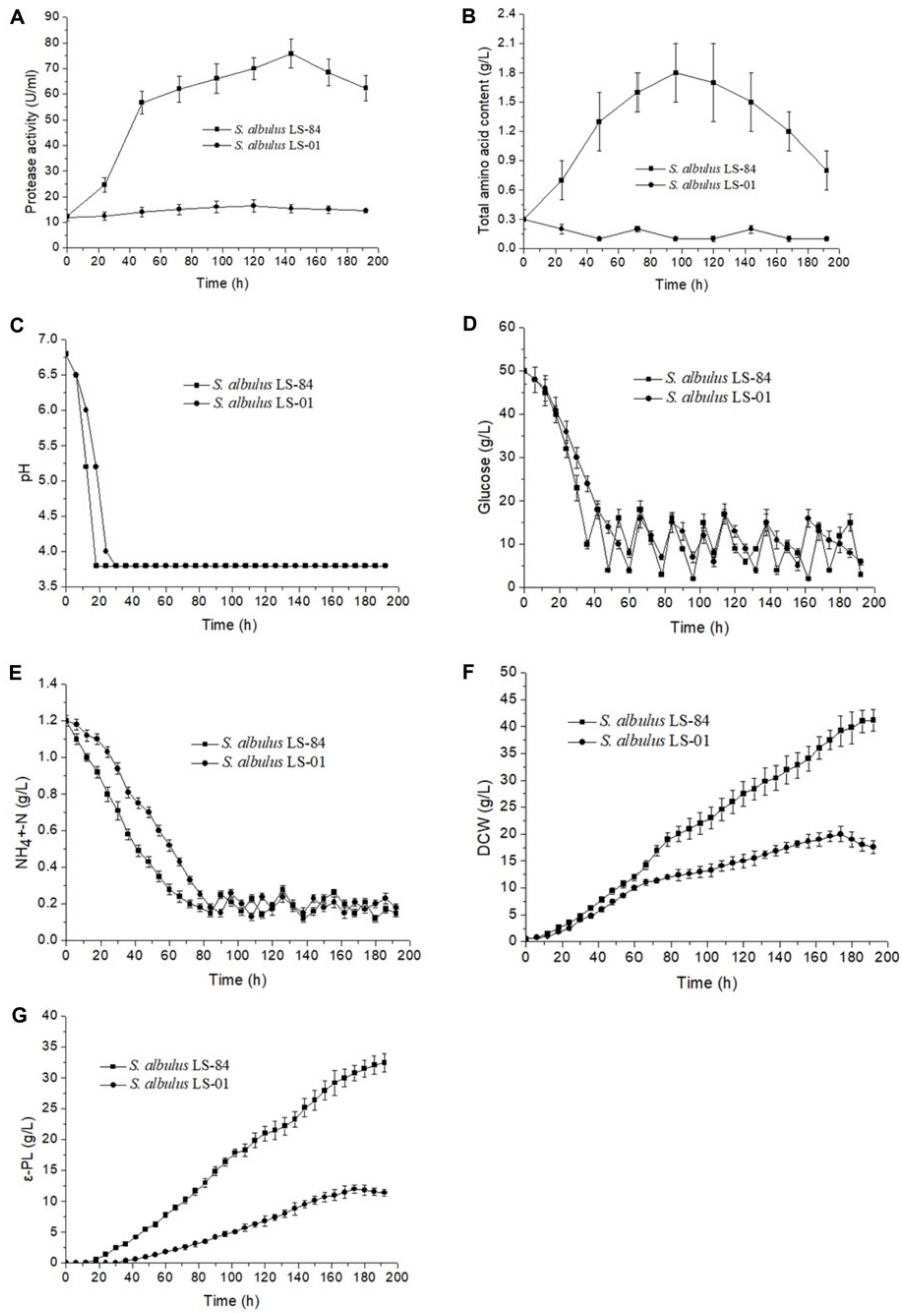


Fig. 4. $\epsilon\text{-PL}$ production by *S. albulus* LS-84 in fed-batch fermentation with 20 g/L of CSR. (A): *S. albulus* LS-01; (B): *S. albulus* LS-84.

between *S. albulus* and *B. subtilis*, the hybrid *S. albulus* LS-84 could effectively utilize the CSR for ϵ -PL production, and therefore the fermentation costs were also reduced.

3.4. Comparison for respiratory activity of *S. albulus*

To determine the respiratory activity of *S. albulus* for ϵ -PL production from CSR, the methods of CTC staining and viability staining were employed in this study [8]. At the preliminary stage of fermentation (30 h), dead mycelia (red fluorescence) of *S. albulus* LS-01 began to appear in the pellets (Fig. 5B), but there were fewer dead than live mycelia (green fluorescence). While for *S. albulus* LS-84, pellets with loose interior structure were observed and there were nearly zero dead mycelia (Fig. 5A). During fermentation, the number of dead mycelia in pellets increased in both LS-01 and LS-84, though differences were still obvious. At 120 h, pellets in LS-84 were small with an even smaller inner core of dead mycelia, while large pellets with a dense layer were formed in LS-01 (Fig. 5), suggesting that only the peripheral mycelia has respiratory activity.

Actually, filamentous bacteria such as *Streptomyces* exhibit diverse morphology in submerged cultivation, ranging

from dispersed mycelia to dense pellets. Morphology is dependent on strain physiology, culture conditions and process parameters. Furthermore, production performance and morphology have been observed to be closely related.

In recent years, some researchers employed inorganic microparticles such as talc, aluminum oxide and titanium silicate oxide in the fermentation broth targeted control of microorganism morphology [17,18]. For example, Ren *et al.* investigated the effects of talc microparticles on mycelia morphology and ϵ -PL production by *Streptomyces* sp. M-Z18, and found that talc microparticles caused a decrease of pellet diameter, meanwhile improved the ϵ -PL production by 50.3%, compared to the control [19]. And in this research, the main composition of CSR is 50% protein and 45%, in which the diatomite played a role as talc microparticles. In the presence of diatomite microparticles, small pellets of *S. albulus* LS-84 were obtained. As is known, small pellets occupied high specific surface area as well as the loose interior structure, which will facilitate the transfer of oxygen and nutrients from medium to mycelia. Thus, mycelia in the small pellets occupied higher activity. Consequently, glucose and NH_4^+ -N consumptions, cell growth and ϵ -PL production were enhanced with CSR supplementary. Moreover, ϵ -PL production is a high energy consuming process, the adequate oxygen and nutrient supply will provide more ATP and precursors for the enhancing of ϵ -PL production and cell growth.

3.5. Comparison for enzyme activities in *S. albulus*

In *Streptomyces* synthesis of ϵ -PL, several enzymes are considered the key enzymes, including HK, PEPC, AK, CS, and Pls [6,8]. Therefore, activities of these enzymes were measured at 120 h of fed-batch fermentation for comparison. All the above enzyme activities in *S. albulus* LS-84 were higher than those in *S. albulus* LS-01 (Table 1). HK is the key enzyme in the glycolytic pathway and its activity in LS-84 was 1.37-fold higher than in LS-01, which was responsible for the more rapid glucose consumption. CS is one of the key enzymes in the TCA cycle and responsible for the first step of catalytic reaction; activity in *S. albulus* LS-84 showed a 1.75-fold improvement over *S. albulus* LS-01, indicating an enhanced flux of the TCA cycle. This result had also been supported by another ϵ -PL-producing strain, USE-51: addition of external citric acid into the medium was reported to result in a significant

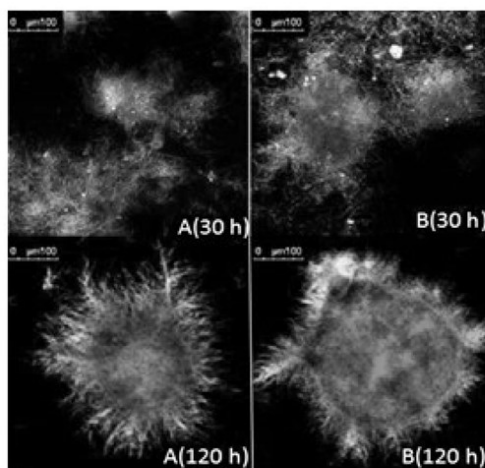


Fig. 5. Determination of the respiratory activity for *S. albulus*. (A): *S. albulus* LS-84; (B): *S. albulus* LS-01. Green fluorescence represents live mycelia and red fluorescence represents dead mycelia.

Table 1. Comparison for enzyme activities in *S. albulus* in fed-batch fermentation at 120 h. Three replicates were performed for each measurement

Strains	HK (U/mg)	PEPC (U/mg)	AK (U/mg)	CS (U/mg)	Pls (U/mg)
<i>S. albulus</i> LS-84	253.7 ± 19.5	176.2 ± 15.7	26.4 ± 3.2	28.3 ± 2.6	87.3 ± 5.7
<i>S. albulus</i> LS-01	184.2 ± 14.6	113.7 ± 16.9	14.1 ± 2.6	16.3 ± 1.6	50.2 ± 4.6

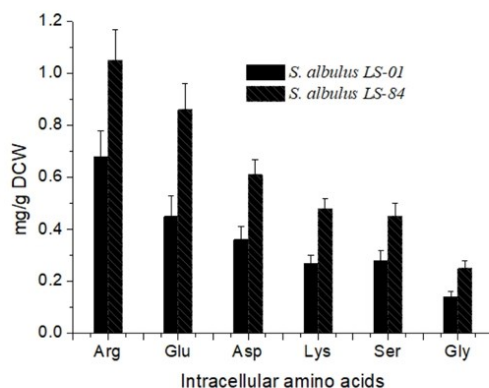


Fig. 6. Comparison for intracellular amino acids in *S. albulus* in fed-batch fermentation at 120 h. Three replicates were performed for each measurement.

increase of ϵ -PL production [4]. In bacteria, L-lysine is mainly synthesized in the diaminopimelic acid (DPA) pathway. DPA is formed via aspartic acid produced by combining oxaloacetate (OXA) with NH_4^+ -N as the nitrogen source, and AK is the key enzyme utilized. The carbon dioxide fixation reaction in bacteria is another source of OXA, because PEPC catalyzes the reaction from PEP to OXA [20]. Therefore, the higher enzyme activities of AK and PEPC in *S. albulus* LS-84 lead to a greater use of the DPA pathway. The polyreaction from L-lysine to ϵ -PL is catalyzed by PIs; consequently, this activity was 87.3 U/mg in *S. albulus* LS-84, which is 74.2% higher than that in *S. albulus* LS-01. This result supports the earlier indication that *S. albulus* LS-84 has a stronger respiratory activity than what is found *S. albulus* LS-01.

3.6. Comparison for intracellular amino acids in *S. albulus* LS-84

Activities of several key enzymes for *S. albulus* LS-84 proved to be higher than those in *S. albulus* LS-01 (Table 1), indicating a more active metabolism in the hybrid. Therefore, concentrations of intracellular amino acids in *S. albulus* were investigated for comparison. Some amino acids exhibiting a distinct difference are shown in Fig. 6, including Arg, Glu, Asp, Lys, Ser, and Gly; for these amino acids, concentrations in LS-84 were 54.4%–91.7% higher than in LS-01. Arg was found in the highest proportion among all intracellular amino acids. In bacteria, Arg can be converted into NH_3 and ATP under the catalytic action by the ADI system, while NH_3 can neutralize the H^+ , and ATP provides energy for H^+ -ATPase [21]. This result is consistent with the fact that ϵ -PL fermentation must depend on an

acidic environment (pH 3.5–4.0). The increase of intracellular Asp and Glu content also strengthened the synthesis of ϵ -PL, because Asp is the precursor of Lys in the DPA pathway, while Glu provides $-\text{NH}_2$ for Lys synthesis [22]. As a result, the intracellular Lys in LS-84 at 77.8% higher than that of LS-01 directly enhanced the ϵ -PL productivity. Additionally, concentrations of Ser and Gly in LS-84 were also higher than in LS-01, suggesting that these two amino acids might be relevant to higher ϵ -PL production. However, the detailed mechanism for this needs further study.

4. Conclusion

In this research, an intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis* for ϵ -PL production from corn starch residues was investigated for the first time. Through protoplast fusion, one hybrid designated *S. albulus* LS-84 was obtained that contained the protease gene from *B. subtilis*, which could effectively utilize the protein in CSR as a nitrogen source. In fed-batch fermentation, LS-84 produced 32.6 g/L ϵ -PL in the presence of 20 g/L CSR, which was an increase of 256.1% compared to the parent strain *S. albulus* LS-01. The rapid hydrolysis of CSR by the protease caused rapid growth for LS-84, which provided higher respiratory activity. As a result, activities of several key enzymes in LS-84 were higher than those in LS-01; furthermore, content of intracellular amino acids such as Asp, Glu, and Arg were also much higher in LS-84. Therefore, intergeneric hybridization between *S. albulus* and *B. subtilis* for ϵ -PL production from CSR is an economical method for effective utilization of waste resources.

Acknowledgements

This work was supported by China Post-doctoral Foundation (2017M622185) and Shandong Natural Science Foundation (ZR2017PC025).

References

- Shima, S. and H. Sakai (1977) Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* 41: 1807-1809.
- Hiraki, J., T. Ichikawa, and S. Ninomiya (2003) Use of ADME studies to confirm the safety of polylysine as a preservative in food. *Regul. Toxicol. Pharm.* 37: 328-340.
- Kahar, P., T. Iwata, J. Hiraki, E. Y. Park, and M. Okabe (2001) Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 190-194.
- Hirohara, H., M. Takehara, M. Saimura, A. Ikezaki, and M. Miyamoto (2006) Biosynthesis of poly(ϵ -L-lysine)s in two newly isolated strains of *Streptomyces* sp. *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* 73: 321-331.
5. Chen, X. S., L. Tang, S. Li, L. J. Liao, J. H. Zhang, and Z. G. Mao (2011) Optimization of medium for enhancement of ϵ -poly-L-lysine production by *Streptomyces* sp. M-Z18 with glycerol as carbon source. *Bioresour. Technol.* 102: 1148-1159.
 6. Xia, J., Z. X. Xu, H. Xu, J. F. Liang, S. Li, and X. H. Feng (2014) Economical production of poly(ϵ -L-lysine) and poly(L-diaminopropionic acid) using cane molasses and hydrolysate of *streptomyces* cells by *Streptomyces albulus* PD-1. *Bioresour. Technol.* 164: 241-247.
 7. Shima, S. and H. Sakai (1981) Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2497-2502.
 8. Wang, L., X. S. Chen, G. Y. Wu, X. Zeng, X. D. Ren, S. Li, and Z. G. Mao (2017) Enhanced ϵ -poly-L-lysine production by inducing double antibiotic-resistant mutations in *Streptomyces albulus*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40: 271-283.
 9. Li, S., L. Tang, X. S. Chen, L. J. Liao, F. Li, and Z. G. Mao (2011) Isolation and characterization of a novel ϵ -poly-L-lysine producing strain: *Streptomyces griseofuscus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 557-563.
 10. Li, S., X. S. Chen, C. D. Dong, F. L. Zhao, and Z. G. Mao (2013) Combining genome shuffling and interspecific hybridization among *Streptomyces* improved ϵ -poly-L-lysine production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 338-350.
 11. Hamano, Y. and I. Nicchu (2007) ϵ -Poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*, has feedback inhibition resistant aspartokinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 873-882.
 12. Murmu, J. and C. William (2007) Phosphoenolpyruvate carboxylase protein kinase from developing castor oil seeds: partial purification, characterization, and reversible control by photosynthate supply. *Planta* 226: 1299-1310.
 13. Kiyohara, H., W. Toshiro, and I. Junko (1990) Intergeneric hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 671-676.
 14. Rojan, P., D. Gangadharan, and K. Madhavan (2008) Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for L-lactic acid production from starchy wastes. *Bioresour. Technol.* 99: 8008-8015.
 15. John, F. and E. Hendrik (1977) Interspecific hybridization between *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium cyaneofulvum* following protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 157: 281-284.
 16. Takehara, M. and H. Hirohara (2010) in Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature. *Springer-Verlag, Berlin, Germany*, pp. 1-22.
 17. Driouch, H., B. Sommer, and C. Wittmann (2010) Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 1058-1068.
 18. Driouch, H., R. Hänsch, T. Wucherpfennig, R. Krull, and C. Wittmann (2012) Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 462-471.
 19. Ren, X. D., Y. J. Xu, X. Zeng, X. S. Chen, L. Tang, and Z. G. Mao (2015) Microparticle enhanced production of ϵ -poly-L-lysine in fed-batch fermentation. *RSC Adv.* 5: 82138-82143.
 20. Helena, B. and G. Hugh (1993) Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): purification of the enzyme, cloning of the ppc gene and over-expression of the protein in a streptomycete. *Biochem. J.* 293: 131-136.
 21. Vrancken, G., T. Rimaux, and S. Weckx (2009) Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 13010. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 216-222.
 22. Zhang, Y., J. Xu, and Z. Yuan (2010) Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer eudragit L-100. *Bioresour. Technol.* 101: 3153-3158.



Enhancement of ϵ -poly-L-lysine production by overexpressing the ammonium transporter gene in *Streptomyces albulus* PD-1

Delei Xu^{1,2} · Haiqing Yao^{1,2} · Changhong Cao^{1,2} · Zhaoxian Xu³ · Sha Li^{1,2} · Zheng Xu^{1,2} · Jiahai Zhou⁴ · Xiaohai Feng^{1,2} · Hong Xu^{1,2}

Received: 14 March 2018 / Accepted: 28 May 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The antibacterial polymer ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) has been widely used as a safe food preservative. As the synthesis of ϵ -PL requires a rich supply of nitrogen, the efficiency of nitrogen translocation and utilization is extremely important. The objective of this study was to improve the production of ϵ -PL by overexpressing the ammonium transporter gene *amtB* in *Streptomyces albulus* PD-1. Using the recombinant bacteria, the optimum carbon-to-nitrogen ratio in the synthesis stage of fermentation increased from 3 to 4.71, compared with that obtained using the wild-type strain, and the utilization efficiency of ammonium was improved too. Ultimately, the production of ϵ -PL increased from 22.7 to 35.7 g/L upon fed-batch cultivation in a 5 L bioreactor. Determination of the expression of the genes and enzymes associated with ammonium metabolism and ϵ -PL synthesis revealed that the overexpression of *amtB* in *S. albulus* PD-1 enhanced ϵ -PL biosynthesis by increasing the activity of the corresponding metabolic pathways. To the best of our knowledge, this is the first report on enhancing ϵ -PL production by overexpression of the *amtB* gene in an ϵ -PL-producing strain.

Keywords ϵ -poly-L-lysine · Nitrogen source · Ammonium transporter · *Streptomyces albulus* PD-1

Introduction

The biopolymer ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) is composed of 25–35 L-lysine residues with linkages between the α -carboxyl and ϵ -amino groups [1]. It is mainly produced by the members of the family Streptomycetaceae [2, 3].

ϵ -PL is regarded as safe for human consumption owing to its broad-spectrum antimicrobial properties, water solubility, thermal stability, and non-toxicity [4]. As such, ϵ -PL has been approved as a food preservative in Japan, Korea, the United States and China [5, 6]. Furthermore, because it is biocompatible and biodegradable, ϵ -PL and its derivatives have been widely used as emulsifiers, biodegradable fibers, high-strength hydrogels, drug carriers, and biochips [7–9]. For example, recent studies demonstrate that the ϵ -PL-based hydrogels can be easily integrated into biological tissues, thus serving as wound dressings [10].

Nitrogen is a constituent element of cellular components such as proteins, nucleic acids and several cofactors [11]. It also regulates primary and secondary metabolism in different bacteria, including *Streptomyces* [12–14]. ϵ -PL is synthesized from L-lysine monomers by a non-ribosomal peptide synthetase, and the polymerization process requires a large amount of L-lysine, which acts as the direct precursor. The supply of a sufficient amount of nitrogen is essential for ϵ -PL fermentation, because each L-lysine molecule contains two nitrogen atoms, although most of the other amino acids have only one. Among the many nitrogen sources, inorganic $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was found to have a strong positive effect on ϵ -PL production

Delei Xu and Haiqing Yao contributed equally to this study.

✉ Xiaohai Feng
fengxiaohai@njtech.edu.cn

✉ Hong Xu
xuh@njtech.edu.cn

- ¹ State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China
- ² Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China
- ³ School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China
- ⁴ State Key Laboratory of Bio-Organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Published online: 05 July 2018

Springer

[4, 15]. Furthermore, some organic nitrogen sources, such as yeast extract and beef extract, were found to contribute to the production of ϵ -PL by promoting cell growth [16, 17]. However, the excessively high nitrogen concentrations affect both the synthesis of enzymes involved in primary and secondary metabolism, as well as the utilization of different nitrogen sources from the fermentation medium [18]. To alleviate its negative effects, the residual nitrogen concentration is often maintained at a suitable level using fed-batch fermentation strategies [19]. With the development of molecular biotechnology, it has become possible to increase the utilization efficiency of nitrogen sources through genetic manipulation [20].

Ammonium transport proceeds in two ways, via free diffusion in the form of NH_3 gas and active transport in the form of the NH_4^+ cation. When NH_3 diffusion across the membrane is limited during metabolism, the ammonium transporter *amtB* is expressed to facilitate the transport of NH_4^+ from the extracellular environment into the cells [12, 21]. Because ϵ -PL is synthesized under acidic conditions of pH 4.0 in the fermentation process [22], ammonia primarily exists in the form of NH_4^+ ions in the fermentation broth. Therefore, NH_4^+ ions enter the cell primarily through the ammonium transporter, providing a nitrogen source for cell growth and ϵ -PL synthesis. Several studies have demonstrated that increasing the expression of genes related to nitrogen transport can significantly enhance the production of many valuable compounds. For example, Sindelar et al. improved L-lysine production by overexpressing the *amtA-ocd-soxA* operon in *Corynebacterium glutamicum* [23]. Similarly, Meng et al. enhanced the synthesis of antibiotics via heterologous expression of nitrate/nitrite transporter genes in *actinomycetes* [24]. Judging by the findings of these studies, the question whether the overexpression of *amtB* in *S. albulus* PD-1 can be used to produce more ϵ -PL remains of great significance.

In this study, the *amtB* gene was overexpressed using different promoters in *S. albulus* PD-1 to investigate its effect on ϵ -PL production. The fermentation results showed a significant increase in the production of ϵ -PL. Furthermore, to elucidate the effects of *amtB* in *S. albulus* PD-1, we analyzed the transcriptional level and enzyme activity of ϵ -PL synthetase and proteins related to nitrogen absorption and assimilation. The findings of this study, thus, broaden our understanding of nitrogen metabolism in *S. albulus* PD-1, and provide an efficient fermentation strategy to improve the industrial fermentation of ϵ -PL.

Materials and methods

Strains and plasmids

The ϵ -PL producer *S. albulus* PD-1 has been deposited in the China Center for Type Culture Collection (Accession

No. M2011043). *Escherichia coli* DH5 α (Tiangen Biotech CO., Beijing, China) was used as the host strain for maintenance and propagation of plasmids. *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) [25] was used as the non-methylating plasmid donor strain for intergeneric conjugation with *S. albulus* PD-1. The chromosomally integrated shuttle vector (*E. coli*/*Streptomyces*), pSET152, which can integrate specifically into the *attB* sites on the *Streptomyces* chromosome via integrase-*attP*-directed site-specific recombination, was used for overexpression of *amtB*.

Culture media

The Luria–Bertani (LB) medium for *E. coli* strains comprised 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl; solid medium was produced by adding 20 g/L agar. Mannitol-soy flour (MS) agar medium comprising 20 g/L mannitol, 20 g/L soy flour, 40 mM MgCl_2 and 20 g/L agar was used for intergeneric conjugation. Medium 3G (M3G) that was used for fermentation consisted of 50 g/L glucose, 10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L yeast extract, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g/L K_2HPO_4 , 1.36 g/L KH_2PO_4 , 0.03 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g/L and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. When required, antibiotics were used at the following concentrations: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apramycin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloramphenicol and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid.

Molecular manipulations

For the construction of *amtB* overexpression plasmids, the strong promoter *PermE** and the original promoter (*P_{amtB}*) of *amtB* were compared (Fig. 1). The nucleotide sequences of *amtB* gene and *amtB* gene with *P_{amtB}* were amplified from genomic DNA of *S. albulus* PD-1 using the primers *amtB-F/amtB-R* and *amtB-F'/amtB-R*, respectively. The promoter *ermE** was amplified from plasmid pIB139 using the primers *PermE*-F/PermE*-R*. The resulting PCR products were inserted into the vector backbone pSET152 which had been digested with the corresponding enzymes to create plasmids pSET152-*PermE*-amtB* and pSET152-*P_{amtB}-amtB* by seamless cloning [26]. The resulting recombinant vectors were introduced into *E. coli* ET12567 and then transferred into *S. albulus* PD-1 by intergeneric conjugation. All the constructed plasmids were verified by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The manipulations were conducted as described before with some modifications [27]. Furthermore, to investigate the effect of pSET152 on ϵ -PL biosynthesis, the empty plasmid pSET152 was also integrated into the *S. albulus* PD-1 genome, generating *S. albulus* PD-1-pSET152. The corresponding primers are listed in Table 1.

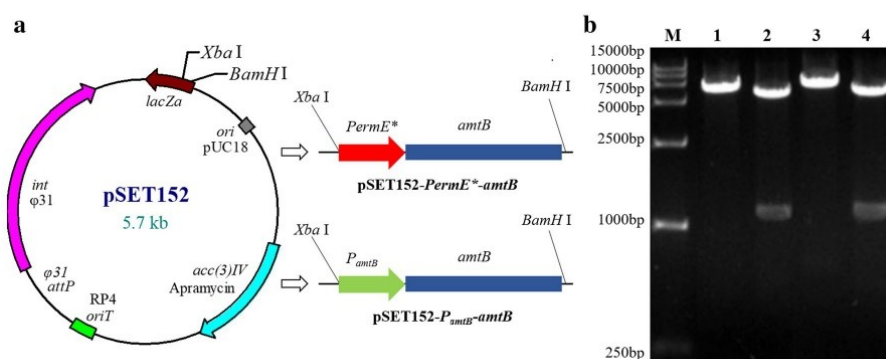


Fig. 1 a Construction of recombinant expression vectors. b Confirmation of recombinant plasmids by restriction enzyme digestion. Marker: DNA molecular weight standard; 1: pSET152-

P_{amtB} -*amtB*/*Xba*I; 2: pSET152- P_{amtB} -*amtB*/*Xba*I + *Bam*HI; 3: pSET152-*PermE**-*amtB*/*Xba*I; 4: pSET152- P_{amtB} -*amtB*/*Xba*I + *Bam*HI

Shake flask two-stage culture

Firstly, cells were cultured 24 h in M3G medium at 30 °C and 200 rpm. The resulting seed cultures were used to inoculate the second stage medium at 10% (v/v), after which fermentation was conducted at 30 °C and 200 rpm for 7 days. In the second stage, the glucose concentration was kept constant at 10 g/L, and the nitrogen content in (NH₄)₂SO₄ were controlled at 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 g/L, 1.5 and 2, respectively. The carbon nitrogen ratio (C/N) (mol/mol) was varied from 23, 16.5, 11.5, 9.17, 4.71, 3 and 2.36 by calculation of the carbon nitrogen ratio formula, respectively. The concentration of NH₄⁺-N was determined according to Zhou et al. [28]. The standard solution of

ammonium was diluted with water to different concentrations and their absorbance determined separately after indophenol blue reaction for 35 min to generate a standard curve of NH₄⁺-N concentrations. The content of carbon and nitrogen in the fermentation broth was based on the initial concentration of glucose and ammonium nitrogen (C_{Glu} and C_{NH₄⁺-N}). The carbon-to-nitrogen ratio (mol/mol) was calculated according to the following formula

$$\frac{C}{N} = \frac{C_{\text{carbon}}}{C_{\text{nitrogen}}} = \frac{(C_{\text{Glu}} \times 6) / 180}{(C_{\text{NH}_4^+ - \text{N}}) / 14}$$

Table 1 Primers used in plasmid construction and qRT-PCR analysis

Primer	DNA sequence (5'-3')
amtB-F	GGATCCAGTGAACCTCTCAGGTTCCGATG
amtB-R	GCGCGGCCGCGGATCCCTACTTCTGCCGCTGTGAGAAGG (<i>Bam</i> HI)
amtB-F'	GCAGGTCGACTCTAGATTGCATACCGCCGCT (<i>Xba</i> I)
PermE*-F	GCAGGTCGACTCTAGATGCATGCGAGTGTCCTG (<i>Xba</i> I)
PermE*-R	AGGTTCACTGGATCCTACCAACCGGCAC
amtB	F: ATCCTCAAGAAGCTCACCGA R: GACGAACAGCTCGAAGCC
gdh	F: AGACCTTCATCTCGGGTCTG R: GAGGTAGGTGTCGCTCCTCGT
glnA	F: TACTTCTCGACACCGTCCT R: AGGAGGACATCGCGTAGC
ask	F: GAGTTCGACATGCTGCTGAC R: ACGGAGTCAGTGATCACACC
pls	F: CGGATTCGTCCAACTCCT R: GACGATGATCAGCCACCA
hrdB	F: CGACTACACCAAGGGCTACA R: TTGTTGATGACCTCGACCAT

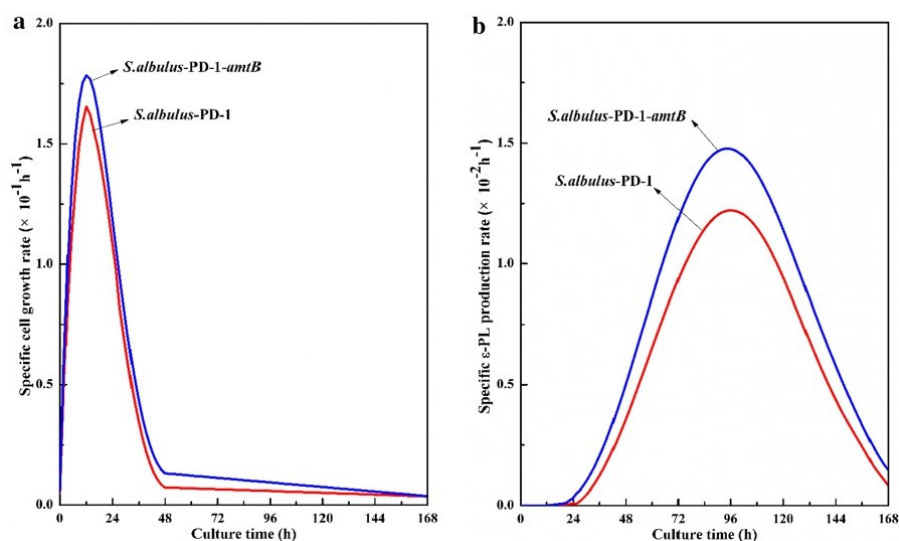


Fig. 4 Comparison of fermentation process parameters in a 5 L bioreactor. **a** Specific cell growth rate. **b** Specific ϵ -PL production rate

of α -ketoglutaric acid could promote the TCA cycle at the same time, providing carbon for L-lysine synthesis [50]. Ultimately, these metabolic changes led to an increase of ϵ -PL production.

In addition, another assimilation system was investigated by measuring the transcription level of the GS gene (*glnA*). It was found to be increased 1.2 times (Fig. 5a) and its enzyme activity accordingly increased from 1.45 to 1.92 U/mg protein (Fig. 5b). Glutamine functions as a nitrogen donor in the synthesis of carbamoyl phosphate, histidine, purines, and glucosamine-6-phosphate, a precursor of peptidoglycan [51]. Therefore, the stronger GS activity promoted the synthesis of more glutamine, which could have improved the growth of the bacteria. By contrast, the transcriptional level of the GOGAT gene (*gltB*) and its enzyme activity were almost unchanged (Fig. 5a, b), which also proved that the GOGAT system does not play an important role at high nitrogen concentrations [12].

Further investigations of the key enzymes in the ϵ -PL synthesis pathway were also conducted. The transcription level of the aspartate kinase gene (*ask*) was found to be increased 1.4 times (Fig. 5a) and its enzyme activity accordingly increased from 37.45 to 52 U/mg protein (Fig. 5b). As the key enzyme of the diaminopimelic acid pathway (DAP), the increase of *ask* activity indicated that more L-lysine was used for the synthesis of ϵ -PL [19]. Furthermore, the transcription level of the ϵ -PL synthetase gene (*pIs*) was found to be increased 1.6 times (Fig. 5a) and the enzyme activity increased from 59.87 to 73.5 U/mg protein (Fig. 5b). These

results suggested that *amtB* overexpression has a profound effect not only on ammonium assimilation but also on ϵ -PL biosynthesis. In conclusion, the overexpression of *amtB* strengthened the transport of ammonium, thereby promoting its assimilation, which in turn resulted in intracellular accumulation of L-lysine and increased the yield of ϵ -PL. Nevertheless, the specific relationship between nitrogen metabolism and the ϵ -PL synthesis pathway is still unclear and further studies are needed.

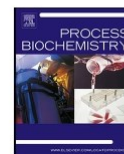
Conclusions

In this study, the *amtB* gene was successfully overexpressed by increasing its transcriptional level in the ϵ -PL-producing strain *S. albulus* PD-1 for the first time. Consequently, the production of ϵ -PL increased from 22.7 to 35.7 g/L in fed-batch culture in a 5 L bioreactor. The analysis of transcriptional and enzyme activity levels showed that the strain's ammonium absorption and assimilation abilities were enhanced, which promoted the ϵ -PL synthesis pathway. Therefore, this study deepens our understanding of nitrogen utilization in the ϵ -PL-producing strain *S. albulus* PD-1, and will provide the basis for improving the production of biochemicals in other actinomycetes by rational engineering.



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Preparation, characterization and antimicrobial activity of ϵ -poly-L-lysine with short chain length produced from glycerol by *Streptomyces albulus*

Xu-Sheng Chen*, Kai-Fang Wang, Gen-Cheng Zheng, Yang Gao, Zhong-Gui Mao*

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

ARTICLE INFO

Keywords:
 ϵ -Poly-L-lysine
 Antimicrobial agent
 Chain length control
 Glycerol
 Food preservative

ABSTRACT

ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) serves as a biological preservative in food industry for many years in several countries. However, the naturally occurring ϵ -PL with the chain length of 25–35 L-lysine residuals exhibits bitter taste. Thus, the decrease of chain length at an appropriate range has become very critical for the wide application of ϵ -PL. Herein, we proposed an efficient strategy for the short chain ϵ -PL production with the high yield (39.84 g/L), high purity (98.81%) and high recovery ratio (72.59%) by fed-batch fermentation using glycerol as carbon source. The short chain ϵ -PL with 8–32 L-lysine residuals showed different secondary structures and better antimicrobial activity towards yeast than naturally occurring one. As a result, a simple, low-cost and safe strategy for high-level production of short chain ϵ -PL was developed, which may enlarge the application of ϵ -PL in the food industry.

1. Introduction

ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) is a unique homo-poly(amino acid), produced by various *Streptomycetaceae* bacteria and some *Bacillus* as well as a few filamentous fungi as a secondary metabolite [1–3]. The typical ϵ -PL is generally composed of 25–35 L-lysine residuals linked by ϵ -amino and α -carboxyl groups with a molecular weight range from 3200 to 4500 Da. It has a wide antimicrobial spectrum of microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and fungi, which is mainly attributed to its isopeptide bond and multi-amino groups [4]. Notably, ϵ -PL strongly inhibits many foodborne pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7 [5], *Listeria monocytogenes* [6], *Staphylococcus aureus* [7]. Moreover, the compound is biodegradable, water-soluble, thermal-stable and non-toxic [8]. Therefore, the ϵ -PL is identified as a generally recognized as safe (GRAS) for use in food industry as an antimicrobial agent by the US Food and Drug Administration [9]. Currently, it is allowed to be used in Japan (1980s), South Korea (1990s), United States (2004), and China (2014) as a biological preservative in food industry [10].

As an emerging food preservative, ϵ -PL exhibits more advantages than conventional preservatives. Compared with chemically synthesized preservatives, such as potassium sorbate, sodium benzoate and nitrite, ϵ -PL shows high safety and environmental friendly properties. For these plant or animal tissue derived preservatives, such as pectin, protamine and propolis, ϵ -PL shows low cost and high stability. For the same origin of microbial preservatives, such as nisin and natamycin, ϵ -

PL has a wider usage pH ranges and high water solubility as well as broad antimicrobial spectrum. Thus, ϵ -PL is an ideal food preservative with more advantages than traditional ones.

Actually, the antimicrobial activity of ϵ -PL is primarily depended on its chain length. It is reported that ϵ -PL with less than 9 L-lysine residues is known to have no antimicrobial activity [11]. However, naturally occurring ϵ -PL with 25–35 L-lysine residues exhibits unpleasant bitter taste, which would limit its application in food industry [12]. Thus, the controlling of ϵ -PL at an appropriate chain length has an important significance for its wide application. At present, four strategies have been employed to produce the short chain ϵ -PL. Since each ϵ -PL-producing strain produces ϵ -PL with different chain length, such as *S. albulus* NBRC14147 with 3.2–4.5 kDa [2]; *Streptomyces* sp. USE-51 with 2.3 kDa [13]; *Kitasatospora* sp. PL6-3 with 5 kDa [14], it is ideal to directly screen strain with short chain ϵ -PL producing from environment. However, the high-yield production of ϵ -PL consisting of 5–20 L-lysine residues only reached 4.5 g/L [15], indicating it has a long way to use this strain in industry. The second strategy is addition of aliphatic short chain polyols or sulfated β -cyclodextrin into culture during fermentation. It was found pentamethylene glycol could effectively regulate the chain length of ϵ -PL [16], and polyanionic sulfated β -cyclodextrin was successfully reduced the molecular weight of ϵ -PL from 3.5 to 4.5 kDa (27–35 mer) to less than 2.5 kDa (~19 mer) [17]. These satisfactory results represented the strategies are promising, but the majority of multi-hydroxyl compounds are difficultly applied in industry in terms of food safety. In respect to the third strategy, the Hamano group

* Corresponding authors.

E-mail addresses: chenxs@jiangnan.edu.cn (X.-S. Chen), maozg@jiangnan.edu.cn (Z.-G. Mao).

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.001>

Received 2 December 2017; Received in revised form 13 February 2018; Accepted 1 March 2018
 1359-5113/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Chen, X.-S., Process Biochemistry (2018), <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.001>

proposed the shortening of ϵ -PL chain length by ϵ -PL-synthetase engineering through linker regions mutagenesis [18]. Unfortunately, the short chain ϵ -PL production of variants is too low and the mechanism is not fully understood. In the previous study, we have prepared the short chain ϵ -PL from the naturally occurring ϵ -PL by the ϵ -PL-degrading enzyme, which is an endo-type protease and purified from *S. albulus* M-Z18 [19]. Although this method has successfully achieved the preparation of short chain ϵ -PL as the fourth strategy, it is difficult to ensure the consistency of chain length distribution among different batches. Moreover, the cost of enzyme preparation is very high and inefficient. Therefore, there is still a lack of effective method to prepare ϵ -PL with short chain length, especially in a large amount.

It was reported short-chain aliphatic polyols could inhibit L-lysine polymerization via esterification and produce short chain ϵ -PL. However, glycerol, one of polyols with high food safety and low cost, was approved non-efficient in the production of ϵ -PL with short chain length [16]. In this study, we carried out short chain ϵ -PL preparation in large amount from glycerol by *S. albulus* M-Z18, and the characteristics of chain length distribution, secondary structure and antimicrobial activity of the short chain ϵ -PL were also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Strain and medium

Streptomyces albulus M-Z18 was used for ϵ -PL production and preserved in our lab. The spores of *S. albulus* M-Z18 were preparation and maintained on the modified Bennett's agar slant, which contained (per liter): glucose, 10 g; beef extract, 1 g; polypepton, 2 g; yeast extract, 1 g; and agar, 18 g, the pH adjusted to 7.0 with 2 M NaOH before sterilization. The M3G medium was used for seed cultivation, which composed of (per liter): glucose, 50 g; yeast extract, 5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g; KH_2PO_4 , 1.36 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g, the pH adjusted to 6.8 with 2 M NaOH solution before sterilization. Fermentation medium was developed in our previous study [20] and made some modification used for ϵ -PL production, which contained (per liter): glycerol/glucose 60 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 g, yeast extract 10 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, the pH adjusted to 6.8 with NH_4OH solution (24%, w/v) after sterilization.

Escherichia coli CICIM B0013, *Bacillus subtilis* CICIM B0629, *Micrococcus tetragenus* CICIM B0126, *Staphylococcus cremoris* CICIM B1294, *Saccharomyces cerevisiae* CICIM Y0086, *Pichia pastoris* CICIM Y0154, *Torulopsis globosa* CICIM Y1017, *Aspergillus niger* CICIM F0015, *Aspergillus oryzae* CICIM F1005, *Penicillium chrysogenum* CICIM F0058 were used for antimicrobial test and gifted from China University Industrial Microbial Resources and Information Center (CICIM), Jiangnan University. The LB medium was used for the growth of *E. coli* CICIM B0013, *B. subtilis* CICIM B0629, *M. tetragenus* CICIM B0126, *S. cremoris* CICIM B1294, which contained (per liter): NaCl, 10 g; tryptone, 10 g; yeast extract, 5 g; the pH adjusted to 7.2-7.4 with 2 M NaOH before sterilization. YPD medium was used for the growth of *S. cerevisiae* CICIM Y0086, *P. pastoris* CICIM Y0154, *Torulopsis globosa* CICIM Y1017, which contained (per liter): yeast extract 10 g; peptone 20 g; glucose 20 g. The PDA medium was used for the growth of *A. niger* CICIM F0015, *Aspergillus oryzae* CICIM F1005, *Penicillium chrysogenum* CICIM F0058, which contained (per liter): glucose, 20 g; potato juice, 200 g; natural pH.

All the media were sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min. In addition, glucose was autoclaved separately and mixed together prior to use in each case. All chemicals, except organic nitrogen source (beef extract, yeast extract, polypepton, tryptone, peptone are in biochemical grade), were used in analytical grade and purchased from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd. (Shanghai, China).

2.2. Preparation of ϵ -PL-contained fermentation broth

In our previous study, a pH control strategy, pH shock, was developed in fed-batch fermentation for the overproduction of ϵ -PL by *S. albulus* M-Z18 [21]. Though a high production of ϵ -PL was obtained (54.7 g/L), a large amount of biomass (76.35 g/L) and a low yield (8.6%) hurt its economy. It would also not be beneficial to separation and purification of the ϵ -PL from that culture broth. To reduce the high biomass, sole organic nitrogen source (yeast extract) was used to replace of the mixed organic nitrogen source (fish meal and corn syrup) as shown in the above medium component, and other conditions were as following:

Aliquot 0.1 mL spore suspension (2×10^5 spores/mL) was inoculated into a 500 mL flask containing 80 mL M3G medium and incubated at 30 °C on a rotary shaker with 200 rpm for 24 h. After the adjustment of temperature, aeration rate, agitation speed and initial pH at 30 °C, 0.5 vvm, 200 rpm, 6.80, respectively, this culture with approximately 300 mL volume was transferred as seed into a 5-L fermenter (Biotech-5BG, Baoxing Bio-Engineering Equipment Co., Ltd., Shanghai, China) contained 3.2 L fermentation medium. In the process of fermentation, the pH shock strategy was adopted: when the pH was naturally declined from the initial 6.80–5.00, maintained pH 5.00 for 10 h by automatic addition NH_4OH (12.5%, w/v), then allowed pH dropping naturally for 12 h, finally restoring pH to 4.00 and kept it constant until the end of fermentation. Dissolved oxygen (DO) was set above 30% of air saturation before pH declined to 4.00 and above 20% of air saturation afterwards, which was controlled by adjusting agitation during fermentation before the agitation reaching the maximum speed. When agitation reached to 800 rpm, aeration rate was then manually increased in the stepwise of 0.5 vvm with a range of 0.5-2.0 vvm. During the fermentation, pH and DO were monitored online by pH and DO electrodes, respectively (K8S-225 and InPro6800, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). When the concentration of glucose or glycerol was low than 10 g/L, sterilized glucose (800 g/L) or glycerol (1200 g/L) solution were automatically added by peristaltic pump to maintain their concentrations at about 10 g/L. When residual ammonia nitrogen ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$) was low than 0.5 g/L, sterilized $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (600 g/L) was fed and maintained its concentration until the end of fermentation.

After 192 h fed-batch fermentation, about 5.0 L fermentation broth was harvested, which mainly contained (g/L): ϵ -PL, ~39; mycelia (dry cell weight), ~50; inorganic ions (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , 1.15 , SO_4^{2-}), ~14; amino acids, ~1; protein, ~2; organic acids, ~3; residual carbon source, ~5; and etc.

2.3. Separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth

In our previous work, a successive process for separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth including flocculation, filtration, ultrafiltration, ion-exchange chromatography, and decoloration was developed [22]. Finally, the purity and recovery of ϵ -PL reached 90.2% and 75.0%, respectively. Although the purity of ϵ -PL had enhanced by 4.88-fold than the original, it was also below the standard requirement ($> 95\%$). To further improve the purity of ϵ -PL, the developed process was modified as following: (1) flocculation and filtration operations were replaced by dilution and centrifugation for the removal of high biomass from fermentation broth in order to reduce the hydrochloric acid addition and decrease the subsequent desalination operation load; (2) active carbon was replaced of macroporous resin for decoloration to simplified operation. The detailed process of ϵ -PL separation and purification from fermentation broth was as following:

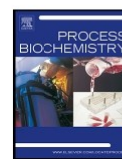
The 1.0 L fermentation broth with about 30% (v/v) wet mycelia was centrifuged at 5000g for 15 min, and repeatedly washed precipitate 3 times with 500 mL deionized water in each. A total 2.0 L of cell-free supernatant was withdrawn for the ultrafiltration with the cutoff molecular weight of 30 kDa membrane (0.1 m^2) using a Pellicon 2 mini



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio



Separation and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth

Xu-Sheng Chen*, Yang Gao, Bin Zhen, Dai Han, Jian-Hua Zhang, Zhong-Gui Mao

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2015
Received in revised form 11 August 2015
Accepted 9 November 2015
Available online xxx

Keywords:

ϵ -Poly-L-lysine
Flocculation
Ion-exchange chromatography
Fermentation broth
Biological food preservative

ABSTRACT

ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) has been widely used in the food industry as a biological preservative like Nissin and natamycin for many years. However, few studies have focused on the separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth. In the present study, a successive process for ϵ -PL separation and purification from fermentation broth was proposed, and two key operation units of solid-liquid separation and ion-exchange chromatography were systematically investigated. Solid-liquid separation was successfully achieved by filtration for fermentation broth flocculated by the addition of 800 mg/L sodium polyacrylate at pH 1.5. The adsorption and desorption of ϵ -PL on Amberlite IRC-50 resin were optimized, and the optimal conditions are as follows: initial ϵ -PL concentration of 15 g/L, pH 8.5, and a flow rate of 1.5 bed volume (BV)/h for adsorption; 0.25 M HCl and a flow rate of 7.0 BV/h for desorption. On the basis of the above results and those from our previous studies, a successive process including flocculation, filtration, ultrafiltration, ion-exchange chromatography, and decoloration was employed to extract ϵ -PL from fermentation broth; 90.2% purity was attained with 75% recovery. This is the first report on the separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth containing a high concentration of ϵ -PL, which will provide guidance for its industrial manufacture.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) is a homo-poly-amino acid produced by certain strains of Actinomycetes and *Bacillus* as an extracellular secondary metabolite [1], and strongly inhibits many foodborne pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7 [2], *Listeria monocytogenes* [3], *Staphylococcus aureus* [4], and *Saccharomyces cerevisiae* [5]. Moreover, it is water soluble, biodegradable, stable, and has a low level of toxicity [6,7]. ϵ -PL has been utilized as a food preservative in meat and fish sushi (1–5 mg/g), rice, cooked vegetables (0.01–0.5 mg/g), and other foods in Japan since the 1990s [1]. The US Food and Drug Administration authorized the use of ϵ -PL as generally recognized as safe (GRAS) at levels of up to 50 mg/kg in food (GRAS 135) in 2003 [8]. Recently, China has declared that ϵ -PL is allowed to be added to food as a preservative in the range of 0.15–0.5 g/kg.

As a biological fermentation product, there are two issues that are of concern to researchers. The first is how to achieve the target product accumulation in larger in the fermentation broth. In the past few decades, much attention has been paid to

improving ϵ -PL production, including high producer strain screening and mutagenesis [9,10], nutrition component optimization [11–13], and bioprocess regulation [14–18], etc. To date, several *Streptomyces* strains have attained ϵ -PL production over 30 g/L, with a maximum of 48.3 g/L. The second issue is how to recover the target product from the complex fermentation broth with high purity, high recovery, and low cost input. Shima and Sakai were the first to investigate the use of cation ion-exchange adsorption, active carbon decoloration, organic solvent precipitation, and gel chromatography for ϵ -PL purification for the structural characterization of the first ϵ -PL-producing strain found [19]. Since the publication of their report, there has been no further literature on ϵ -PL purification over the next 30 years. Until recently, an ultrafiltration technique with 2 and 5 kDa cutoff molecular weight membranes has been used to prepare ϵ -PL with different molecular weight distributions from the raw material of ϵ -PL hydrochloride [20]. Bankar et al. [21] systematically investigated the purification of ϵ -PL from fermentation broth using cation exchange chromatography, ultrafiltration, solvent precipitation, and gel permeation chromatography, achieving the highest ϵ -PL purity and yield thus far, at 97.58% and 90.42%, respectively. However, the treatment fermentation broth only contained 2 g/L ϵ -PL, and there is a big discrepancy between this amount and those in actual industrial production. Compared with the first issue, few studies have focused

* Corresponding author. Fax: +0086 510 85918279.
E-mail address: chenxs@jiangnan.edu.cn (X.-S. Chen).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.010>
1359-5113/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: X.-S. Chen, et al., Separation and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth, Process Biochem (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.010>

on the separation and purification of ϵ -PL due to the complexity of this heterogeneous system, which contains microbial cells, metabolites, pigments, and colloidal matrix, etc. In fact, the cost of recovery of the microbial product from the broth is a significant part of the total production cost of the product.

In our previous studies, we mutated a high-yield ϵ -PL production strain [22], optimized media components [23–25], and developed pH control strategies [26,27] for the efficient production of ϵ -PL. Furthermore, we also investigated the use of a macroporous resin for the removal of pigments from fermentation broth, and optimized the dynamic adsorption conditions, finally achieving a decoloration ratio of 83.9% with a ϵ -PL recovery ratio of 97.3% [28]. On the basis of the above, the present study was aimed at providing a potential industrial route for ϵ -PL separation and purification from fermentation broth containing a high concentration of ϵ -PL (30 g/L). Flocculation and filtration were employed for solid–liquid separation, and the filtrate was then processed by successive application of ultrafiltration (30 kDa), cation exchange chromatography, decoloration with a macroporous resin, and a final ultrafiltration step (1 kDa). Meanwhile, the parameters of protein removal ratio, ϵ -PL loss ratio, and ϵ -PL purity were evaluated in every operation unit, and the purified product was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and characterized using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and equipments

Sodium polyacrylate (Anion, molecular weight of 1×10^7 Da) was purchased from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd. (Shanghai, China). Amberlite IRC-50 and macroporous resin SX-8 were provided by Rohm and Haas Company (Philadelphia, PA) and Suqing Water Treatment Engineering Group (Jiangsu, China), respectively. Media components used for ϵ -PL fermentation were all in analytical grade, beside glucose and yeast extract as well as beef extract, which were purchased from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd. (Shanghai, China). Standard ϵ -PL sample was provided by Zhejiang Silver-Elephant Bio-engineering Co., Ltd. (Tiantai, China) with 95% purity. A 0.17 m² filter with 10 frames was customized in Yongsheng Co., Ltd. (Haining, Zhengjiang, China). Pellicon 2 mini ultrafiltration system (0.1 m²) with two membrane packages (30 kDa and 1 kDa) was purchased from Merck Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2. Preparation of ϵ -PL fermentation broth [25]

Streptomyces albulus M-Z18 (formally named *Streptomyces* sp. M-Z18) was used for ϵ -PL fermentation and preserved in our lab. The seed medium was composed of (g/L): glucose, 50; yeast extract, 5; (NH₄)₂SO₄, 10; KH₂PO₄, 1.36; K₂HPO₄, 0.8; MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.04; FeSO₄·7H₂O, 0.03, pH 6.8. The fermentation medium was composed of (g/L): glycerol 60; beef extract 5; MgSO₄·7H₂O 0.5; KH₂PO₄ 0.13; Na₂HPO₄·12H₂O 0.14, pH 6.8. The fed-batch fermentation was carried out in a 5-L fermentor (BIOTECH-5BG, Baoxing Bio-Engineering Equipment Co., Ltd., Shanghai, China) with a 3.5-L work volume using a two-stage pH control strategy at 30 °C and 200–800 rpm. In the feeding stage fermentation, sterilized 100% glycerol was automatically added by peristaltic pump to maintain the concentration of glycerol in broth at about 10 g/L. Residual ammonia nitrogen (NH₄⁺-N) was maintained at about 0.5 g/L by feeding 600 g/L sterilized (NH₄)₂SO₄ solution just as the feeding of glycerol. When the consumption rate of glycerol decreased significantly, the ϵ -PL fed-batch fermentation

was stopped. The fermentation broth contained: 30 g/L ϵ -PL, wet mycelium volume 30% (v/v), protein 2.0–3.0 g/L, residual carbon source glycerol 5–12 g/L, residual NH₄⁺ concentration 1.0–2.0 g/L, and residual SO₄²⁻ concentration 0.5–1.0 g/L. In this study, all the following operations for ϵ -PL purification were carried out at room temperature.

2.3. Solid–liquid separation of fermentation broth by flocculation

Flocculation can be used to aggregate cells to increase the effective “particle” size and hence easy sedimentation, centrifugation and filtration [29]. In the present study, an anionic polymer flocculant sodium polyacrylate has been chosen to aggregate *S. albulus* M-Z18 mycelium, and effects of different pHs and flocculant doses on flocculation have been evaluated.

To investigate the influence of pH on flocculation, fermentation broth was adjusted in the range of pH 1.0–pH 12.0 in presence of 800 mg/L sodium polyacrylate. However, floc was apparently formed at below pH 3.0. Thus, we focused on the flocculation in the range of pH 0.5–pH 2.5 in the presence of 800 mg/L sodium polyacrylate. A 100 mL fresh fermentation broth contained 30 g/L ϵ -PL was added to a 250 mL breaker. After adjusting the broth pH from initial 4.1 to 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 and 0.5 with 6 M HCl, respectively, 67 mL sodium polyacrylate mother liquid (2 g/L) was supplemented to those different pHs fermentation broth. Subsequently, a rapid stirring (200 rpm) was implemented for 2 min to promote full contact between the flocculant and mycelium, and then slow stirring (75 rpm) for 3 min was maintained for floc growth. Instead of flocculant, 67 mL deionized water was added to the same volume fresh fermentation broth without pH adjustment (pH 4.10) as control. After flocculation, the suspension was filtered by filter paper (Φ 7 cm) under 0.05 MPa vacuum. During the process of filtration, the filtration time t (min) was defined as the time length between the first and last droplet (the last droplet defined as no droplet was formed in 20 s), and the filtration rate Q (L/m² h⁻¹) was calculated by the following equation:

$$Q = \frac{V}{t \times S}$$

where V is the total volume of filtrate (L), t is the filtration time (h), S is the area of filter paper (3.85×10^{-3} m²).

In order to investigate flocculant dose on flocculation, the pH of fresh fermentation broth was firstly adjusted to pH 1.5 with addition of 6 M HCl. Then, 67 mL different concentrations of sodium polyacrylate mother liquid were supplemented to the 100 mL fermentation broth in 250 mL breaker, and achieved the final flocculant dose at 600, 800, 1000, 1200 and 1400 mg/L, respectively. Instead of flocculant, 67 mL deionized water was added to the same volume fresh fermentation broth with pH adjustment to pH 1.5 as control. Similarly, a rapid stirring (200 rpm) was implemented for 2 min and slow stirring (75 rpm) for 3 min. After flocculation, the suspension was also filtered by filter paper under 0.05 MPa vacuum. The filtration time and filtration rate were calculated as the above mentioned.

2.4. Optimization of ϵ -PL adsorption and desorption conditions on resin by dynamic experiment

It is known that the molecular weight of ϵ -PL distributes in the range of 2500–4500 Da, showing it is a mixture product. Thus, it is difficult to separate it from impurities only depended on molecular weight difference. However, ϵ -PL has many free amino groups, which can be used by ion-exchange resin and achieve ϵ -PL purification. In this study, the adsorption and desorption condition of ϵ -PL on Amberlite IRC-50 has been evaluated.

Table 1
Orthogonal experiment factors and levels.

Level	A, ϵ -PL concentration (g L ⁻¹)	B, pH	C, Flow rate (BV h ⁻¹)
1	30	6.0	1.5
2	20	8.0	3.0
3	15	8.5	5.0
4	10	9.0	7.0

In order to optimize the best condition for ϵ -PL adsorption on Amberlite IRC-50, adsorption capacity was chosen as the index. The 4³ orthogonal experiment design was used to obtain the optimal adsorption conditions, i.e., uploading ϵ -PL concentration, pH, uploading flow rate. The factors and levels were shown in Table 1. 70 g IRC-50 resin was pretreated by 1 M HCl–1 M NaOH–1 M HCl and deionized water, and then filled in a glass column (40 mm \times 300 mm). The uploading conditions were referred to Table 2. When the effluent was mixed with Dragendorff reagent and produced apparent precipitation, loading operation is stopped. The adsorption capacity (q , mg ϵ -PL/g resin) of ϵ -PL on Amberlite IRC-50 was calculated by the following equation:

$$q = \frac{C_1 \times V_1}{W}$$

where C_1 is the uploading ϵ -PL concentration (g/L), V_1 is the uploading volume (L), W is the dry weight of Amberlite IRC-50 (g).

To develop an efficient desorption strategy, different HCl concentrations (0.1 M, 0.25 M, 0.5 M) at different elution flow rates (4.0 BV/h, 7.0 BV/h, 9.0 BV/h) were employed to treat IRC-50 resin saturated with ϵ -PL under the above optimal adsorption conditions after 5 BV deionized water washing. The elution operation is ended when no precipitation formation in the effluent mixing with Dragendorff reagent. ϵ -PL desorption ratio as well as the final pH and ϵ -PL concentration in the eluent were employed to evaluate the best desorption condition. The ϵ -PL desorption ratio (D , %) was calculated by the following equation:

$$D = \frac{C_2 \times V_2}{C_1 \times V_1} \times 100\%$$

where C_2 is the ϵ -PL concentration in eluent (g/L), V_2 is the volume of eluent (L).

Table 2
Effect of sample conditions on adsorption capacity of ϵ -PL on Amberlite IRC-50.

Groups	Factors			Adsorption capacity (mg g ⁻¹)	Groups	Factors			Adsorption capacity (mg g ⁻¹)
	A	B	C			A	B	C	
1	1	1	1	31.24 \pm 1.36	9	3	1	3	17.16 \pm 0.21
2	1	2	2	29.73 \pm 0.83	10	3	2	4	16.18 \pm 0.07
3	1	3	3	24.15 \pm 0.62	11	3	3	1	127.94 \pm 2.36
4	1	4	4	21.77 \pm 0.91	12	3	4	2	36.28 \pm 0.86
5	2	1	2	19.60 \pm 0.39	13	4	1	4	13.61 \pm 0.10
6	2	2	1	35.33 \pm 0.12	14	4	2	3	15.36 \pm 0.31
7	2	3	4	19.65 \pm 0.25	15	4	3	2	29.22 \pm 0.11
8	2	4	3	20.39 \pm 0.37	16	4	4	1	113.81 \pm 1.96
K1	106.89	81.61	308.32						
K2	94.97	96.60	114.83						
K3	197.56	200.96	77.06						
K4	172.00	192.25	71.21						
R	25.65	29.83	59.27						
Primary relations C > B > A									
Optimal combinations A3 B3 C1									

K1–K4: sums of adsorption capacity of ϵ -PL on resin at levels of 1–4, respectively. R (range) = (the maximum K value – the minimum K value)/3. Primary relations: the sequence of influencing magnitude for ϵ -PL adsorption capacity, i.e., Flow rate > pH > ϵ -PL concentration. The optimal combinations: the initial ϵ -PL concentration at 15 g/L uploading at pH 8.5 with 1.5 BV/h flow rate.

2.5. Separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth

On the basis of the present study and our previous investigation on decoloration and ultrafiltration, we proposed a route for ϵ -PL purification from fermentation broth, shown in Fig. 1. The flow chart was divided into five parts and the specific operation parameters in each unit are described as followed:

Operation unit 1: About 3.5 L fresh fermentation broth was adjusted to pH 1.5 using 6 M HCl. Then, 2 g/L sodium polyacrylate mother liquid was added to the broth with the final concentration at ~800 mg/L accompanying with a rapid stirring (200 rpm, 2 min) and a slow stirring (75 rpm, 3 min). Finally, the flocculated broth was pumped to a frame filter (0.17 m²) equipped with 10 frames and microfiltration membrane (pore size 1 μ m) at 0.1 MPa pressure.

Operation unit 2: The filtrate was adjusted pH to 6.5 with 6 M NaOH. Then, ultrafiltration with the cutoff molecular weight of 30 kDa membrane (0.1 m²) was used to removal some soluble macromolecules impurities under 0.10–0.15 MPa inlet pressure.

Operation unit 3: The ultrafiltration filtrate was adjusted pH to 8.5 with 6 M NaOH, and maintained ϵ -PL concentration in ultrafiltration filtrate at about 15 g/L through diluting or concentrating operation. Subsequently, 300 mL filtrate was uploaded at 1.5 BV/h to the column (40 mm \times 300 mm) filled with 100 mL Amberlite IRC-50. After loading, 4–6 BV deionized water was employed for washing resin, and 0.25 M HCl had been used to elute ϵ -PL from resin at 7.0 BV/h.

Operation unit 4: The elution was adjusted pH to 7.0 with 6 M NaOH, and diluted ϵ -PL concentration to about 7 g/L. Then, the elution was uploaded at 1.0 BV/h to the column (40 mm \times 300 mm) filled with 100 mL macroporous resin SX-8.

Operation unit 5: The effluent was concentrated by ultrafiltration with the cutoff molecular weight of 1.0 kDa membrane (0.1 m²) at 0.1 MPa inlet pressure. When the volume of the above solution was reduced to 100 mL, 200 mL deionized water was supplemented and continued to ultrafiltration operation for three times.

Subsequently, the above desalinated solution was further concentrated with rotary evaporator to about 20 mL under 0.05 MPa and 50 °C. The solid ϵ -PL sample was obtained by freeze drying. In each operation unit, samples with approximately 0.1 g solid substance was taken out and freeze dried, and used to determine the content of protein and ϵ -PL for calculating the protein removal ratio, ϵ -PL loss ratio and ϵ -PL purity.

Please cite this article in press as: X.-S. Chen, et al., Separation and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth, Process Biochem (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.010>

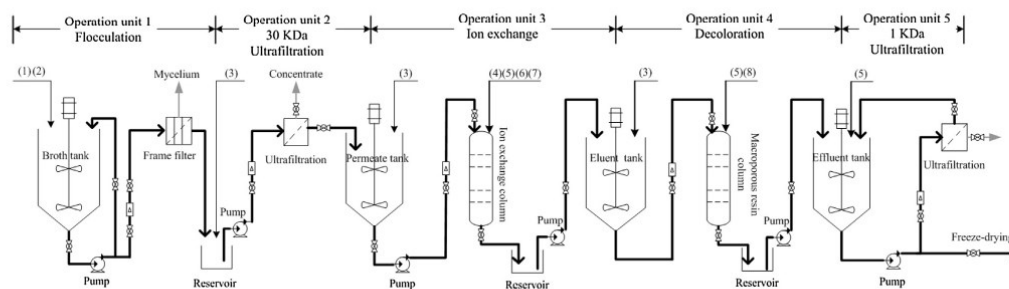


Fig. 1. Scheme of ϵ -PL separation and purification from fermentation broth. (1) Fresh fermentation broth; (2) 6 M HCl; (3) 6 M NaOH; (4) 1 M HCl; (5) deionized water; (6) 1 M NaOH; (7) 0.25 M HCl; (8) 40% aqueous ethanol.

2.6. Analytical methods

The concentration of ϵ -PL was determined using methyl orange precipitation method [30]. In brief, an equal volume of sample with 0.06–0.12 g/L ϵ -PL diluted with 0.07 mM phosphate buffer (pH 6.90) and 0.7 mM methyl orange solution were mixed together, which reacted at 30 °C with shaking for 30 min. The interaction of cationic ϵ -PL with anionic methyl orange in the mixture led to form a water-insoluble complex, the ϵ -PL concentration can be estimated from the absorbance at 465 nm of the methyl orange remaining in the supernatant solution through standard curve calculation.

The protein concentrations were determined using the Bradford protein assay kit with bovine serum albumin (BSA) as the standard [31].

ϵ -PL was analyzed by HPLC (Chromaster, Hitachi, Japan) equipped with an ODS-120T column (4.6 mm \times 250 mm; Tosho Co., Ltd., Tokyo) and a UV spectrophotometer detector (Chromaster, Hitachi, Japan). The mobile phase was 10 mM K_2HPO_4 and 10 mM Na_2SO_4 aqueous solution (pH 3.4 adjusted by H_3PO_4); acetonitrile (23:2, v/v) at a flow rate of 0.4 mL/min. The operating conditions were as follows: monitoring wavelength, 215 nm; injection volume, 100 μ L; column temperature, 30 °C.

ϵ -PL was characterized by MALDI-TOF-MS (Autoflex 2, Bruker Daltonics Inc., USA) and 2,5-dihydroxybenzoic acid was used as a matrix.

3. Results and discussion

3.1. Separation of mycelium from ϵ -PL fermentation broth by flocculation

Solid–liquid separation is one of the most important steps when recovering biotechnological products from fermentation broth. ϵ -PL is generally produced by extraction and purification from filamentous *Streptomyces* fermentation broth, which is highly viscous, with a high wet mycelium content (30%, v/v). Separation via centrifugation is costly, and flocculation is a good alternative in the industrial process of cell removal from fermentation broth via polyelectrolyte addition due to its lower cost and larger capacity. Flocculation can aggregate cell debris and protein contaminants into larger flocs, thereby decreasing broth viscosity, as well as simplifying solid–liquid separation [32]. Sodium polyacrylate was selected as a suitable flocculant based on a preliminary experiment in which dozens of potential flocculants were tested. The effects of pH and sodium polyacrylate dose on the filtration parameters are shown in Figs. 2 and 3.

As illustrated in Fig. 2, the filtration time was significantly reduced with a decrease in pH from 4.1 (control) to 1.5; however, the filtration time remained stable when the pH dropped below 1.5.

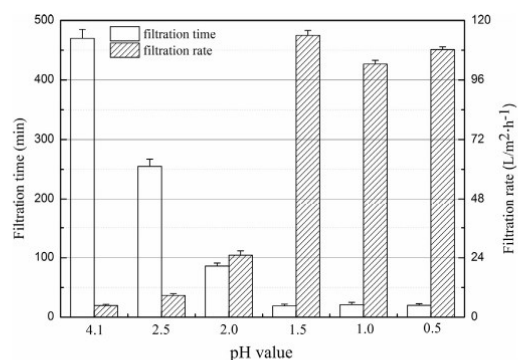


Fig. 2. Effect of pH on filtration parameters at the addition of 800 mg/L sodium polyacrylate.

Notably, the filtration rate appeared to be enhanced with decreasing pH, and the maximum filtration rate reached $114.7 L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ at pH 1.5; thereafter, the filtration rate remained relatively stable. Thus, adjustment of the fermentation broth pH to 1.5 may optimize filtration. In fact, in this extremely low pH environment, *Streptomyces* cells were cationized, and agglomerated together easily with the help of the anionized sodium polyacrylate.

The effect of different doses of sodium polyacrylate on the fermentation broth filtration parameters at pH 1.5 is exhibited in Fig. 3, which shows that the filtration rate was positively correlated with the flocculant concentration from 0 to 800 mg/L. However, the filtration rate decreased rapidly when the flocculant concentration rose above 800 mg/L, indicating that additional flocculant supplemented would decrease filtration efficiency (Fig. 3A). This phenomenon is similar to that of the γ -aminobutyric acid-producing *Enterococcus raffinosus*, which is separated from the fermentation broth by chitosan flocculation [33]. Fig. 3B presents the process of different concentrations of flocculant added to the fermentation broth. The figure shows that the flocs appeared at a concentration of 400 mg/L, were clearly formed at 600 mg/L, and sedimented out at 800 mg/L, which confirms that the dose of 800 mg/L sodium polyacrylate is sufficient for flocculation.

3.2. Adsorption and desorption of ϵ -PL on Amberlite IRC-50 resin

ϵ -PL is a polyamino polymer containing 25–35 side chain amino groups that has an isoelectric point of about 9.0. The usage of ion-exchange principles to separate ϵ -PL from impurities dependent on charge differences in specific pH environments is reasonable. Shima

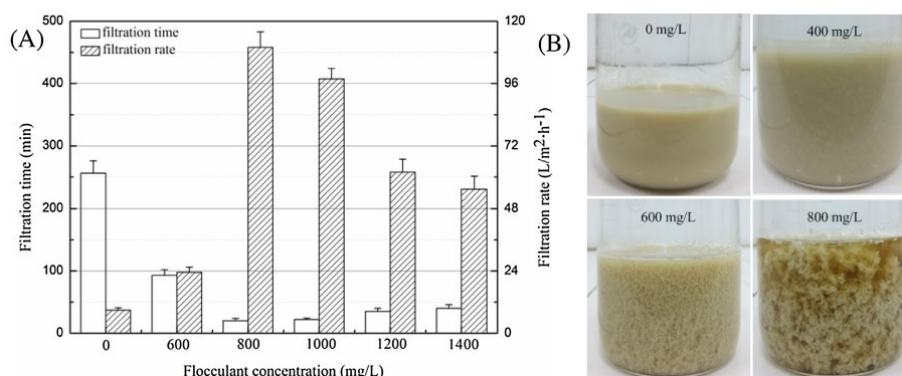


Fig. 3. Effect of different sodium polyacrylate concentrations on filtration parameters (A) and floc formation (B) at pH 1.5.

and Sakai [19] first tried to purify ϵ -PL on a cation resin Amberlite IRC-50, and more recently, Bankar et al. [21] also employed this resin for ϵ -PL separation from fermentation broth. However, the optimal conditions for ϵ -PL adsorption and desorption on Amberlite IRC-50 have not yet been evaluated.

In our preliminary experiment, Amberlite IRC-50 was confirmed to be the best resin for ϵ -PL purification through screening of dozens of weak cation resins by static tests. To investigate the most important adsorption parameters, i.e., ϵ -PL concentration, pH, and flow rate, on resin adsorption capacity, 4³ orthogonal experiments were designed, and the results are shown in Table 2. The results showed that the flow rate had the largest influence on ϵ -PL adsorption capacity, followed by pH, and then ϵ -PL concentration. The

loading flow rate is the biggest determinant of the contact time between the resin and solution [34]. Thus, the optimal loading conditions for efficient ϵ -PL adsorption on the Amberlite IRC-50 were: initial ϵ -PL concentration of 15 g/L, pH 8.5, and flow rate of 1.5 BV/h. Finally, the highest adsorption capacity of the ϵ -PL on the resin reached 127.94 mg/g.

ϵ -PL hydrochloride is the main product formed; thus, hydrochloric acid is usually used as the eluent. Fig. 4 shows the effects of different concentrations of hydrochloric acid at different flow rates on the ϵ -PL desorption parameters. The figure shows that a ϵ -PL desorption ratio of >93% was achieved at the tested HCl concentrations regardless of the flow rate, suggesting that HCl is an efficient eluent for desorbing ϵ -PL from the Amberlite IRC-50.

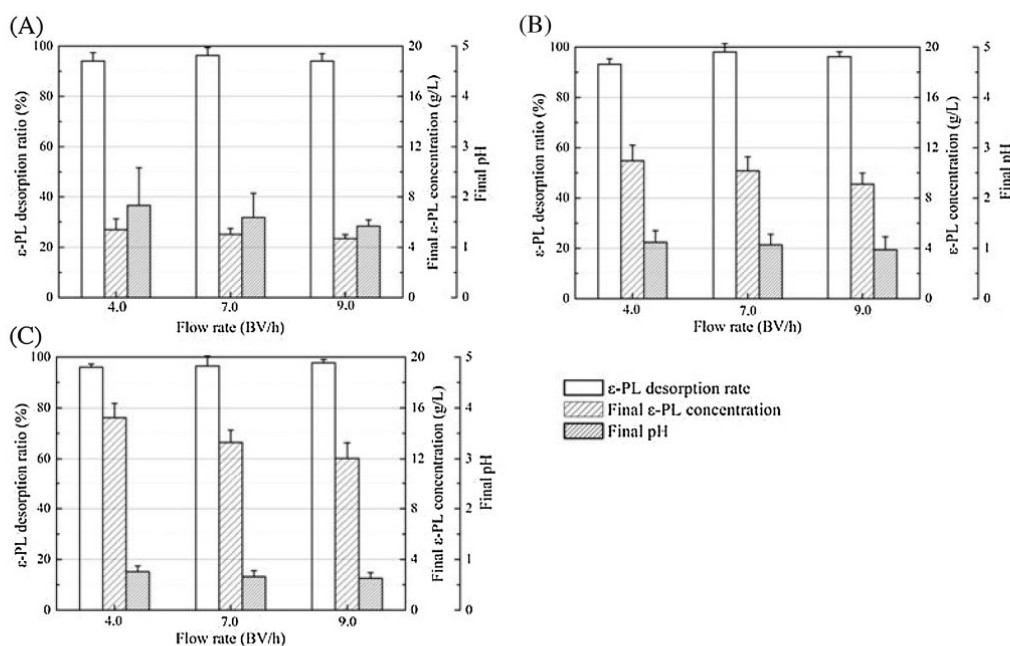


Fig. 4. Effect of flow rate on elution parameters using 0.1 M HCl (A), 0.25 M HCl (B) and 0.5 M HCl (C).

Please cite this article in press as: X.-S. Chen, et al., Separation and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth, Process Biochem (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.010>

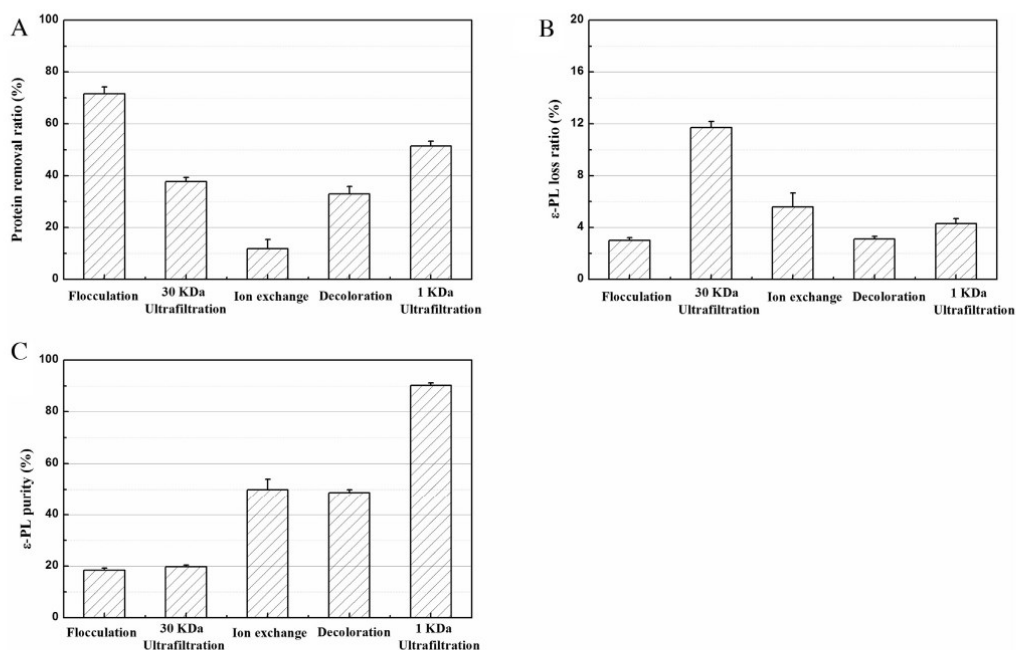


Fig. 5. Process parameters of separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth in terms of protein removal (A), ϵ -PL loss (B) and ϵ -PL purity (C).

The final ϵ -PL concentrations in the eluent rose with increasing HCl concentration at each tested flow rate; however, the ϵ -PL concentration decreased with increasing flow rates in each HCl solution. Unfortunately, since the final pH drops with increasing HCl concentration, more alkaline solution is thus needed for neutralization, resulting in high levels of salt production, which could increase the subsequent desalting load. The resin volume reduced dramatically when a highly concentrated HCl solution was used as the eluent; this phenomenon was most evident at 0.5 M HCl. Taken together, an HCl concentration of 0.25 M and a flow rate of 7.0 BV/h were chosen as the optimal elution conditions, which achieved the maximum ϵ -PL desorption rate of 98.1% and the highest ϵ -PL concentration at 10.2 g/L, as well as a higher pH of 1.1.

3.3. Separation and purification of ϵ -PL from the fermentation broth

Based on the above optimizations, and combined with the previously developed macroporous resin decoloration method [28] and the ultrafiltration method introduced, we proposed a strategy for ϵ -PL separation and purification from the fermentation broth. This strategy was divided into five operation units and its scheme is shown in Fig. 1; the purification process parameters are illustrated in Fig. 5.

As shown in Fig. 5a, flocculation could remove 70% of the protein from the fermentation broth through electrostatic attraction, demonstrating that the majority of the protein can be cationized at pH 1.5 and easily interacts with sodium polyacrylate. Ultrafiltration with 30 kDa and 1 kDa cutoff molecular weights removed 40% and 50% of the protein or peptides in the fractions, respectively. Macroporous resin decoloration removed 30% of the protein in the fractions. However, the ion-exchange process only removed 10% of the protein in the fractions, showing that the cationized protein

had already been removed by the flocculant. Fig. 5b demonstrates that the 30 kDa ultrafiltration process resulted in the highest ϵ -PL loss rate (12%), which may be due to the ϵ -PL and the proteins being trapped together and removed by ultrafiltration in a concentrated solution. It is noteworthy that the rates of ϵ -PL loss in the other processes were less than 5%. Fig. 5c illustrates that ion exchange and 1 kDa ultrafiltration are the main steps for enhancing ϵ -PL purity. In fact, ion exchange could remove non-ionizing and negative charge substances at pH 8.5, and 1 kDa ultrafiltration could remove much of the salt derived from the iterative pH adjustment. As a result, the final ϵ -PL product attained a purity of 90.2%, which was 4.88-fold that of the flocculation filtrate sample, while the recovery yield reached 75%. Further, HPLC analysis showed that the purified ϵ -PL sample achieved 91.8% purity and exhibited the same chromatogram shape as that of the ϵ -PL standard (Fig. 6A). Mass spectra characterization showed that the purified ϵ -PL sample had a wide polymerization degree distribution; the main polymerization was a 26-mer, which is five lysine residuals less than the standard ϵ -PL. This may be due to differences in the ϵ -PL producer strain [35] and/or carbon source [36].

4. Conclusion

In this study, routine technologies such as flocculation, ion-exchange chromatography, macroporous resin decoloration, and ultrafiltration were successively applied in the separation and purification of ϵ -PL from fermentation broth. To our knowledge, this is the first study on the removal of high content wet mycelium from ϵ -PL fermentation broth by flocculation with sodium polyacrylate. Moreover, the adsorption and desorption of ϵ -PL on Amberlite IRC-50 resin were optimized. Finally, a scheme of ϵ -PL separation and purification from fermentation broth was proposed, achieving 90.2% purity with 75% recovery. The results presented

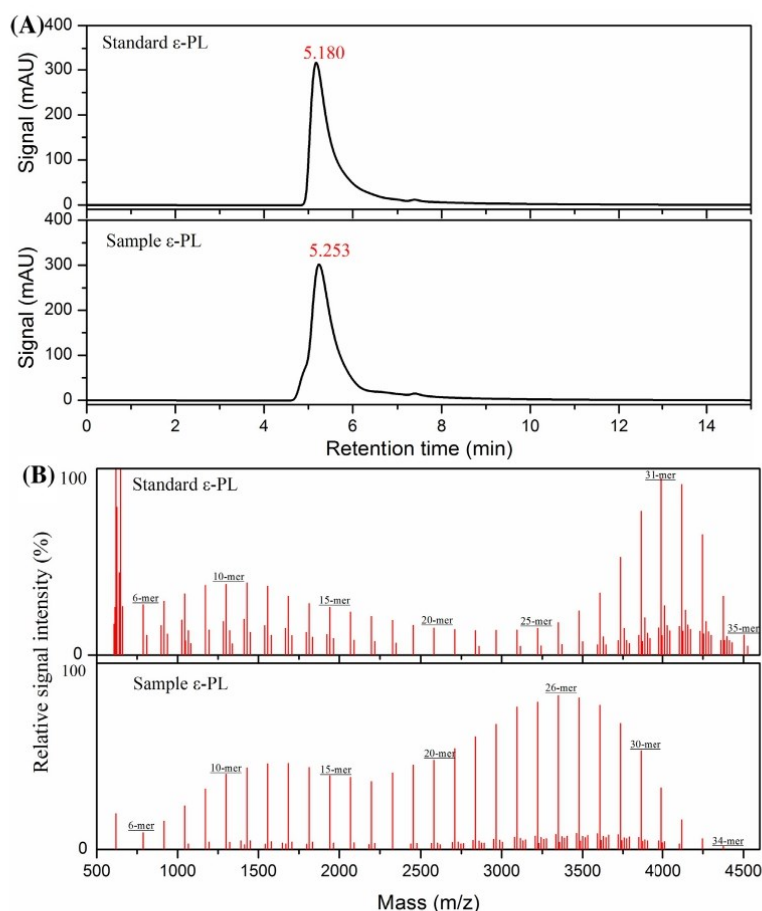


Fig. 6. HPLC chromatograms (A) and MALDI-TOF-MS spectra (B) of the standard ϵ -PL and purified ϵ -PL product. Degree of ϵ -PL polymerization in mass spectra is calculated by the equation: $(M/Z-18.02)/128.17$.

here suggest that the scheme will have a guiding influence on the separation and purification of ϵ -PL from industrial fermentation broth.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Cooperation Project of Jiangsu Province among Industries, Universities and Institutes (BY2013015-11), the National Natural Science Foundation of China (31301556), the Jiangsu Province "Collaborative Innovation Center for Advanced Industrial Fermentation" Industry Development Program, the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, and the 111 Project (111-2-06).

References

- [1] A.K. Pandey, A. Kumar, Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymers epsilon-poly-L-lysine, *Process Biochem.* 49 (2014) 496–505.

- [2] R. Ye, H. Xu, C. Wan, S. Peng, L. Wang, H. Xu, Z.P. Aguilar, Y. Xiong, Z. Zeng, H. Wei, Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439 (2013) 148–153.
- [3] I. Geornaras, Y. Yoon, K.E. Belk, G.C. Smith, J.N. Sofos, Antimicrobial activity of epsilon-polylysine against *E. coli O157:H7*, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts, *J. Food Sci.* 72 (2007) 330–334.
- [4] Y.Q. Li, Q. Han, J.L. Feng, W.L. Tian, H.Z. Mo, Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, *Food Control* 43 (2014) 22–27.
- [5] T. Bo, M. Liu, C. Zhong, Q. Zhang, Q.Z. Su, Z.L. Tan, P.P. Han, S.R. Jia, Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ -poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 4454–4465.
- [6] T. Yoshida, T. Nagasawa, epsilon-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 21–26.
- [7] J. Hiraki, T. Ichikawa, S. Ninomiya, H. Seki, K. Uohama, H. Seki, S. Kimura, Y. Yanagimoto, J.W. Barnett Jr., Use of ADME studies to confirm the safety of epsilon-polylysine as a preservative in food, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37 (2003) 328–340.
- [8] S.S. Chang, W.Y. Lu, S.H. Park, D.H. Kang, Control of food borne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by epsilon-polylysine, *Int. J. Food Microbiol.* 141 (2010) 236–241.
- [9] M. Nishikawa, K. Ogawa, Distribution of microbes producing antimicrobial epsilon-poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3575–3581.

Please cite this article in press as: X.-S. Chen, et al., Separation and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth, *Process Biochem* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.010>