Производство аминокислот

Сферы практического применения препаратов аминокислот

1) в **пищевой промышленности** (около 30 % производимых аминокислот):

- ***Цистеин -*** предотвращает пригорание пищи, улучшает качество хлеба при выпечке, усиливает запах пищи;
- ***Глицин*** - обладает освежающим, сладковатым вкусом, используется при производстве напитков;
- ***Глутаминовая кислота*** – для усиления вкуса и консервирования пищи;

2) в **медицинской и фармацевтической практики**:

лекарственные препараты, *смеси для ЛП*, *для терапии послеоперационных больных*, *язвенной болезни*, *печени*, психических заболеваний

(***серотонин, аспарагин, валин, гистидин, глицин и др***.);

3) в **химической промышленности** аминокислоты используют как предшественники :

- *в производстве детергенов*,
- *в производстве полиаминокислот*,
- *в производстве полиуретана и т.п.*;

4) в **сельском хозяйстве**:

- *как кормовые балансирующие добавки*.

Существует 4 способа промышленного получения незаменимых аминокислот:

1) ***гидролиз природного белоксодержащего сырья***;

2) ***химический синтез***;

3) ***микробиологический синтез***;

4) ***биотрансформацией предшественников аминокислот*** с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-

Получение аминокислот гидролизом природного белоксодержащего сырья

В качестве источников для гидролиза ***<u>используют</u>***:

- *<u>отходы мясоперерабатывающей промышленности</u>* (отходы обработки животного сырья, кровь и т.д.),
- *<u>яичный белок</u>*,
- *<u>казеин молока</u>*,
- *<u>клейковина пшеницы</u>*,
- *<u>соевый шрот</u>* и т.д.

При гидролизе белоксодержащее сырье *<u>нагревают с растворами кислот и щелочей</u>*, при температуре от 100 до 105 ºС в течение 20…48 часов. При этом аминокислоты переходят в гидролизат.

Для **выделения отдельных аминокислот** из гидролизата проводят сложную многостадийную очистку, включающую в себя:

- *нейтрализацию среды выделения,*
- *ионообменную хроматографию,*
- *аффинную хроматографию,*
- *концентрирование АК,*
- *лиофилизацию АК с последующей фасовкой*.

Основные недостатки данного способа:

1. Сложность процесса выделения и очистки,
2. Кроме того, **само сырье** считается *дефицитным* и *дорогим*, поэтому **аминокислоты имеют высокую себестоимость**.
3. **Часть аминокислот может разрушиться** (таких как триптофан, цистеин, метионин, тирозин),
4. **Происходит рацемизация**.

Получение аминокислот химическим синтезом

Химический синтез аминокислот занимает второе место по объему производства (около 30%).

Основные недостатки химического синтеза:

1. ***Получение смеси аминокислот, состоящей из D- и L-изомеров*** (биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-изомеры).

Некоторые из D-изомеров токсичны для человека и животных.

Исключением в этом отношении является ***метионин***, у которого биологически активными являются как D-, так и L-изомеры, в связи, с чем данная аминокислота производится преимущественно путем химического синтеза.

2. Производство аминокислот ***связано с использованием дорогостоящего оборудования*** и ***агрессивных токсических соединений в качестве исходного сырья***.

3. ***Процесс***, как правило, ***протекает при высокой температуре***,

4. ***Требует дорогостоящих катализаторов***,

5. ***Сопровождается образованием побочных продуктов***,

6. ***Загрязняет окружающую среду***,

7. ***Небезопасно*** и ***вредно для обслуживающего персонала***.

Микробиологический способ производства аминокислот

Более 60 % всех производимых чистых ***препаратов аминокислот*** получают путем микробиологического синтеза.

1. Данный способ производства аминокислот включает в себя *биосинтез аминокислот высокоактивными штаммами-продуцентами* и *технологические операции по получению различных товарных форм*.
2. При микробиологическом синтезе *образуются только L-аминокислоты*.
3. Чаще всего для синтеза аминокислот *используют ауксотрофные мутантные штаммы.*
4. На основе культивирования микроорганизмов для получения чистых препаратов аминокислот *применяют промышленные технологии, включающие* ***одно- и двухступенчатый синтез***

При ***одноступенчатом синтезе*** в промышленных культиваторах *выращивают ауксотрофные регуляторные мутанты*, *являющиеся сверхпродуцентами аминокислот*.

После завершения рабочего цикла их выращивания:

- *культуральную жидкость отделяют от клеток микроорганизмов*,
- *культуральную жидкость сгущают*,
- *получают* из нее товарный *продукт с высокой концентрацией синтезированной микробами аминокислоты*.

В процессе ***двухступенчатого синтеза*** аминокислоты:

1. *получают предшественника аминокислоты* (часто более дешевым химическим синтезом),
2. с помощью ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, *превращают предшественник в аминокислоту*, при этом образуется только L-изомеры.

В качестве источника фермента могут быть использованы *суспензия клеток микроорганизмов* **или** *полученный после разрушения этих клеток ферментный раствор*.

Этим методом можно производить практически все аминокислоты, **но** из-за дороговизны и сложности получения кислот-предшественников этот метод не всегда экономически выгоден и в большинстве случаев уступает методу прямого микробиологического

Продуценты аминокислот.

В качестве продуцентов аминокислот используют *генетически измененные штаммы, обладающие способностью к сверхсинтезу аминокислот*.

Лучшими продуцентами аминокислот являются ***ауксотрофные мутанты*** (микроорганизмы, лишенные ряда ферментных систем, поэтому очень требовательны к составу питательной среды, в которой должно присутствовать большое количество факторов роста).

В качестве продуцентов аминокислот используют ***грамположительные бесспоровые бактерии родов*** :

- *Corynebacterium*,
- *Brevibacterium,*
- *Micrococcus*.

Производство аминокислот с помощью ауксотрофных мутантов

Для производства аминокислот бактерии стали использовать **с начала 50-х гг**., при этом штаммы бактерий постоянно *улучшали генетическими методами*, выделяя *ауксотрофные мутанты* и *мутанты с измененными регуляторными свойствами*.

Образовывать аминокислоты способны бактерии многих родов:

Виды ***Corynebacterium*** или ***Brevibacterium***, выращиваемые на *углеродном сырье*, на *этиловом спирте* или *ацетате* при наличии достаточного количества ***биотина*** в питательной среде ***способны синтезировать до 30 г/л глутамата***.

Условия накопления глутамата:

1. Полное или частичное подавление активности α-кетоглутаратдегидрогеназы,
2. Добавление β-лактамных антибиотиков,
3. Добавление ПАВ и жирных кислот.

Путем *изменения условий среды* процесс ферментации, в ходе которого образуется L-глутамат, *может быть переключен* на синтез **L-глутамина** или **L-пролина**:

- при *высокой концентрации биотина* и *ионов аммония* создаются благоприятные условия для образования ***L-пролина***,

- при *больших концентрациях ионов аммония* и *цинка* в *слабо кислой среде* усиливается синтез ***L-глутамина***.

Ауксотрофные мутанты применяются, когда необходимо синтезировать соединения являющиеся ***конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций***:

Например: *L-аспартат* является *общим предшественником* для ***L-лизина, L-треонина, L-метионина и L-изолейцина***.

Первая реакция в процессе образования этих аминокислот катализируется **аспартокиназой**, активность, которой может быть ингибирована по механизму отрицательной обратной связи при совместном действии *L-лизина, L-треонина*.

У *мутантов ауксотрофных по гомосерину или* ***треонину*** (*метионину*) существенно уменьшается внутриклеточная концентрация ***L-треонина***, что снимает блокаду с аспартокиназы и позволяет клеткам накапливать ***L-лизин***.

Ауксотрофные мутанты способны накапливать ***конечные продукты неразветвленных путей биосинтеза***.

В таких случаях приходится отбирать мутанты с *частично нарушенной регуляцией биосинтеза*, что позволяет получить повышенный выход конечного продукта. *Такие мутанты называются* ***регуляторными***, их *отбирают по устойчивости* к аналогам аминокислот или среди ревертантов ауксотрофов.

В основе использования аналогов аминокислот лежит сходство с природными аминокислотами. Они ингибируют рост бактерий, но этот эффект может быть уменьшен путем добавления соответствующей аминокислоты.

Таким образом, *аналоги выступают в роли искусственных*, работающих по принципу отрицательной обратной связи, ***ингибиторов ферментов***

Для увеличения выходааминокислот можно воспользоваться как **ауксотрофией**, так и **дефектами регуляции** одновременно.

Например: у ***Corynebacterium glutamicum*** и ***Brevibacterium flavum*** сверхпродукции **L-треонина** не наблюдается, т.к. не происходит сочетанного ингибирования по механизму отрицательной обратной связи ***аспартокиназы*** L-треонином, и L-лизином, а L-треонин ингибирует г***омосеридегидрогеназу***.

Мутант, устойчивый к аналогу треонина синтезирует в избыточном количестве **треонин**, т.к. его ферменты ингибированные этой аминокислотой, *десенсибилизированы*.

Гомосеридегидрогеназа и ***киназа***, принимающие участие в синтезе треонина также *«выключаются» L-метиокином*, и поэтому ауксотрофы по метионину образуют ***L-треонин*** с еще большим выходом.

Регуляторные мутанты можно получить путем ***трансдукции***, проводя отбор мутаций, вызывающих полное рассогласование регуляторных механизмов, затем

Получение глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота (α-аминоглутаровая):

– *первая аминокислота, полученная путем промышленного микробиологического синтеза*;

- важнейшая аминокислота растительных и животных белков, не относится к *незаменимым*;

- глутамат натрия *усиливает вкус* пищевых продуктов,

- *способствует длительному сохранению вкусовых качеств* консервированных продуктов;

- за рубежом *глутамат натрия добавляют во все продукты* не только при консервировании, но и при замораживании и просто хранении;

- глутаминовая кислота *стимулирует пищеварение*.

Производство глутаминовой кислоты является крупнотоннажным биотехнологическим производством (**> 400 000 т/г**).

Ведущие страны–производители - **Япония** и **США**

Продуценты глутаминовой кислоты:

- дрожжи,
- микроскопические грибы,
- бактерии (*обеспечивают наибольший выход*).

Бактерии - продуценты: ***Micrococcus***, ***Brevibacterium***, ***Corynebacterium***.

Сверхсинтез кислоты возможен при *торможении скорости роста* и *увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты*:

- наличие **биотин (1–5 мкг/л),**
- присутствие **некоторых антибиотиков**
- ***высокая концентрация аммония в среде***,
- ***высокая активность НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы,***
- ***отсутствие или дефект α-кетоглутарат-дегидрогеназы***.

Стадии производства глутаминовой кислоты :

1.Приготовление питательной среды.

- Питательная среда содержит *5 % сахарозы*, *1 % мочевины*, *1,5 % мелассы* и *по 0,1 % сульфата магния, одно- и двухзаме-щенного фосфата калия*; *pH 6,8 – 7,5*; температура *30 °С*.

- Инкубация на каждой стадии *длится 24 ч*.

- Инокулят готовят в *аэробных условиях* на среде такого же состава в ферментерах объемом 200 л и 5 $м^3$ до получения 6–8 г/л сухой биомассы.

2. Производственное культивирование:

- Инокулят (5–6 %) переносят в главный ферментер объемом 50 $м^3$, 70 % общего объема которого занимает **питательная среда** следующего состава: *8,5–10 % сахарозы*, *1,2 % мелассы*, *0,5 % мочевины*, по *0,1 % одно- и*

- *Интенсивность аэрации* – 40–45 мг O_2 л/мин, pH 7,8–8,0, температура – 30 °С.

- Ферментация длится 2 сут. (за это время в среде накапливается глутаминовой кислоты ***до 50 г/л)***.

3. Освобождение целевого продукта из биомассы методом *центрифугирования.* Фильтрат осветляют *активным углем*.

4. Концентрирование культуральной жидкости в выпарном аппарате *до 40–50 % абсолютно сухого вещества* при температуре ***не выше 70 °С***.

5. Кристаллизация и последующее подкисление целевого продукта до *pH 3,2* и охлаждение его *до 15 °С* до тех пор пока в маточном растворе остается ***не более 20–30 г*** глутаминовой кислоты.

Постферментационная стадия

(**получение высокоочищенных препаратов)** :

1. ***в культуральную жидкость добавляют***:

- ***негашеную известь*** или *известковое молоко*,
- затем *избыток ионов осаждают кислотой*,
- осадок удаляют *центрифугированием*.

2. фильтрат ***осветляют активированным углем***

3. ***сорбируют на ионообменных смолах***

4. ***концентрируют вакуум-выпариванием*** при 40–60 °С.

5. ***Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты*** проводят в изоэлектрической точке (*pH 3,2 при 4–15 °С*).

В результате перекристаллизации чистота продукта достигает **99,6 %.**

7. кристаллы кислоты отделяют от маточника *центрифуги-рованием*, *промывают* и *сушат*.

Для получения глутамата натрия -

кристаллы глутаминовой кислоты ***обрабатывают гидроокисью натрия***:

1. влажные кристаллы растворяют в воде,
2. нейтрализуют 40–50 % раствором едкого натра,
3. полученный раствор фильтруют,
4. упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 60 %
5. направляют на перекристаллизацию,
6. полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием,
7. высушивают током горячего воздуха.

Содержание чистого вещества составляет ***98 %.***

Микробиологический синтез лизина

Лизин – алифатическая незаменимая аминокислота:

- структурные элемент белка,
- является предшественником карнитина и оксилизина,
- способствует секреции пищеварительных ферментов
- способствует транспорту кальция и стронция в клетки,
- улучшает общий азотный баланс в организме.

Наиболее дешевым и освоенным способом получения лизина является ***микробиологический метод***.

Впервые такое производство налажено в **Японии** в середине 50-х гг.; затем в *Голландии* и *США*.

Лизин – алифатическая незаменимая аминокислота:

- структурные элемент белка,
- является предшественником карнитина и оксилизина,
- способствует секреции пищеварительных ферментов
- способствует транспорту кальция и стронция в клетки,
- улучшает общий азотный баланс в организме.

Наиболее дешевым и освоенным способом получения лизина является ***микробиологический метод***.

Впервые такое производство налажено в **Японии** в середине 50-х гг.; затем в *Голландии* и *США*.

Продуцентами лизина являются - *бактерии*, *актиномицеты*, *сине-зеленые водоросли*.

Сейчас получены штаммы, способные вырабатывать **до 60 г/л** и более аминокислоты.

В основе производства положен ***одноступенчатый микробиологический синтез*** (включают промышленное культивирование ауксотрофных мутантов бактерий из рода ***Corynebacterium***) .

Аспарагиновая кислота → Гомосерин → ***Треонин***

↓ ↓ ↓

Полуальдегид аспарагиновой кислоты | Цистотионин | α-Кетомасляная кислота

↓ ↓ ↓

Дигидропиколиновая кислота | Гомоцистеин | α-Кетоизолейцин

↓ ↓ ↓

α,ε-Диаминопимелиновой кислота | ***Метионин*** | ***Изолейцин***

↓

Лизин

Мутантные клетки, не образующие ***гомосерин-дегидрогеназы***, при культивировании на искусственной питательной среде *обеспечивают высокий выход лизина*.

Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками (*гомосерин, треонин, метионин*), вводятся в состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

В процессе культивирования микроорганизмов ***обеспечивается подача стерильного воздуха*** с помощью специальных *турбинных мешалок*, для предотвращения вспенивания субстрата и клеточной суспензии в среду культивирования ***добавляют пеногасители***.

Приготовление **питательной среды** :

- *источника углерода* используют смеси, включающие **уксусную кислоту и свекловичную мелассу**, **небольшие добавки сахара** (1 %) повышают выход лизина на 30–50 %;

- в качестве ***источника азота*** – **соли аммония**, **мочевину**, **кукурузный экстракт**

- в качестве ***источника биологически активных веществ*** (1,2–1,5 % по содержанию сухих веществ), гидролизаты дрожжей.

- ***дефицитные аминокислоты*** - **гомосерин, треонин, метионин**.

- ***необходимые для жизнедеятельности*** микроорганизмов **микро- и макроэлементы**, **витамины** (биотин и др.).

- среда должна содержать (в л): **200 мг метионина**, **800 мг треонина**, **15–20 мкг биотина**.

- соотношение **углерода и азота** оптимально как **11: 1**.

Посевной материал - вначале выращивается в посевных аппаратах *при 28–32 °С, pH 7–7,2 в течение 18–24 ч*.

Суспензия клеток подается в ферментеры, в которых поддерживается *постоянный режим аэрации*, *избыточное давление 20–30 кПа*, *непрерывное перемешивание*, контроль за всеми параметрами среды.

Культивирование осуществляется *в строго стерильной глубинной аэробной* периодической культуре.

Время ферментации составляет 55–72 ч.

Накопление в культуральной жидкости **лизина** начинается *через 25–30 ч* после начала выращивания промышленной культуры и к концу ферментации достигает **40–50 г/л**.

Культуральную жидкость отделяют от культуры клеток продуцента *фильтрованием* и используют для получения лизина.

Производство нескольких видов продукции: *жидкий* ***концентрат лизина*** (ЖКЛ), ***сухой кормовой концентрат лизина*** (ККЛ), ***высококонцентрированные кормовые*** и ***высокоочищенные кристаллические препараты*** .

1. ***ЖКЛ*** получают *выпариванием культуральной* жидкости на ваккум-выпарной установке до концентрации 40 %. Для предотвращения деградации лизина при нагревании добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до pH 4,5–5,0, в результате образуется соль – **монохлоргидрат лизина**.

2. ***Сухой кормовой концентрат лизина*** - *жидкий* концентрат *сушат горячим воздухом* на распылительной сушилке при 90 °С до влажности 4–8 % (препарат содержит 15–20 % монохлоргидрата лизина, 15–17 % белков, 14 % аминокислот, витамины группы В, минеральные вещества). Далее *высушивают* на вальцово-ленточной сушилке и *гранулируют*. Гранулированный препарат ККЛ

3. Для получения ***очищенного высококонцентрированного препарата лизина*** культуральную жидкость *после фильтрования подкисляют соляной кислотой* до pH 1,6–2.

Образовавшийся раствор монохлоргидрата лизина направляют на *колонки с катионитом*.

Затем *проводят десорбцию аминокислоты* элюированием *0,5–5 % раствором аммиака*.

Элюат *выпаривают под вакуумом* при 60 °С до концентрации 30–50 %.

После подкисленный соляной кислотой раствор монохлоргидрата *высушивают*.

Путем *перекристаллизации* полученной соли можно получить препараты с содержанием монохлоргидрата лизина в количестве **97–98 %**

Микробиологический синтез триптофана

Отсутствие или дефицит ***триптофана*** в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (*диабет, туберкулез, пеллагра*).

Для производства триптофана применяют:

- ***одноступенчатый синтез*** с помощью бактериальных ауксотрофных мутантов с нарушенной регуляцией синтеза аминокислот;

- ***двухступенчатый синтез***, включающий вначале получение предшественника триптофана, а затем его ферментативное превращение в *триптофан* .

Для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования **триптофана** необходимо *блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую*, что достигается действием мутагенных факторов.

Схема синтеза триптофана, фенилаланина и тирозина:

Фосфопируват **Эритрозо-4-фосфат**

↓

5-Дегидрохинная кислота ←

↓

Шикимовая кислота

↓

Хоризмовая кислота → Антраниловая кислота → ***Триптофан***

↓

Префеновая кислота → n-Оксифенилпировиноградная кислота

↓ ↓

Фенилпировиноградня кислота ***Тирозин***

↓

Фенилаланин

Продуценты - ауксотрофные мутанты рода ***Bacillus subtilis*** с нарушенным синтезом фенилаланина и *тирозина*.

Все технологические процессы организованы по той же схеме, что и получение **лизина**. Ферментация длится **48 ч** при **37°С**, концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает **10 г/л**

Синтез триптофана в нашей стране производится преимущественно по ***двухступенчатой схеме***:

- Вначале *методом химического синтеза* получают предшественник триптофана – ***антраниловую кислоту***

- ***Антраниловую кислоту*** затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в **триптофан**.

Биохимическое превращение антраниловой кислоты в **триптофан** происходит **в 3 этапа**:

- ***на I этапе*** из антраниловой кислоты с участием *фосфорибозилпирофосфата* образуется ***аминогликозид-N-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота***,

- ***на 2 этапе*** *аминогликозид-N-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота* в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбоксилирования превращается в ***индол-3-глицерофосфат***.

- ***на 3 этапе*** под действием фермента триптофансинтетазы *из индол-3-глицерофосфата и серина* образуется **триптофан**.

В качестве активной группы у фермента триптофансинтетазы служит **пиридоксальфосфат**. В качестве источника ферментов используют *дрожжи* .

Производственный процесс биохимического превращения антраниловой кислоты в триптофан проводится в **две стадии**.

- **На I стадии** производится **наращивание биомассы дрожжей**, являющихся *продуцентами ферментов*.

Питательная среда для выращивания дрожжей готовится *из свекловичной мелассы*, *мочевины*, *минеральных солей*.

Ферментация продолжается в течение *24 ч при 30 °С*.

Далее в ферментер **вводят спиртовой 5 % раствор антраниловой кислоты** и **50 % раствор мочевины**.

Через 3–4 ч после добавления *антраниловой кислоты* в ферментер дополнительно подается ***меласса в виде 25 %*** раствора.

На последующих этапах ферментации *периодически производится подача антраниловой кислоты и мочевины через каждые 6 ч и раствора мелассы – через каждые 12 ч.*

Длительность ферментации около 120 ч, с учетом