

# **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 используют:*

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

При гидролизе белоксодержащее сырье нагревают с растворами кислот и щелочей, при температуре от 100 до 105 °С 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 бесспорные 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  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы,
2. Добавление  $\beta$ -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 выхода аминокислот 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 **гомосеридегидрогеназу**.

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

**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 крупно-тоннажным 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  $\alpha$ -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 двухзамещенного фосфата калия; рН 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<sup>3</sup> до получения 6–8 г/л сухой биомассы.

## **2. Производственное культивирование:**

- Инокулят (5–6 %) переносят в главный ферментер объемом 50 м<sup>3</sup>, 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<sub>2</sub> л/мин, рН 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 рН 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

центрифугированием, 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:

- структурный элемент белка,
- является предшественником карнитина и оксализина,
- 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:

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

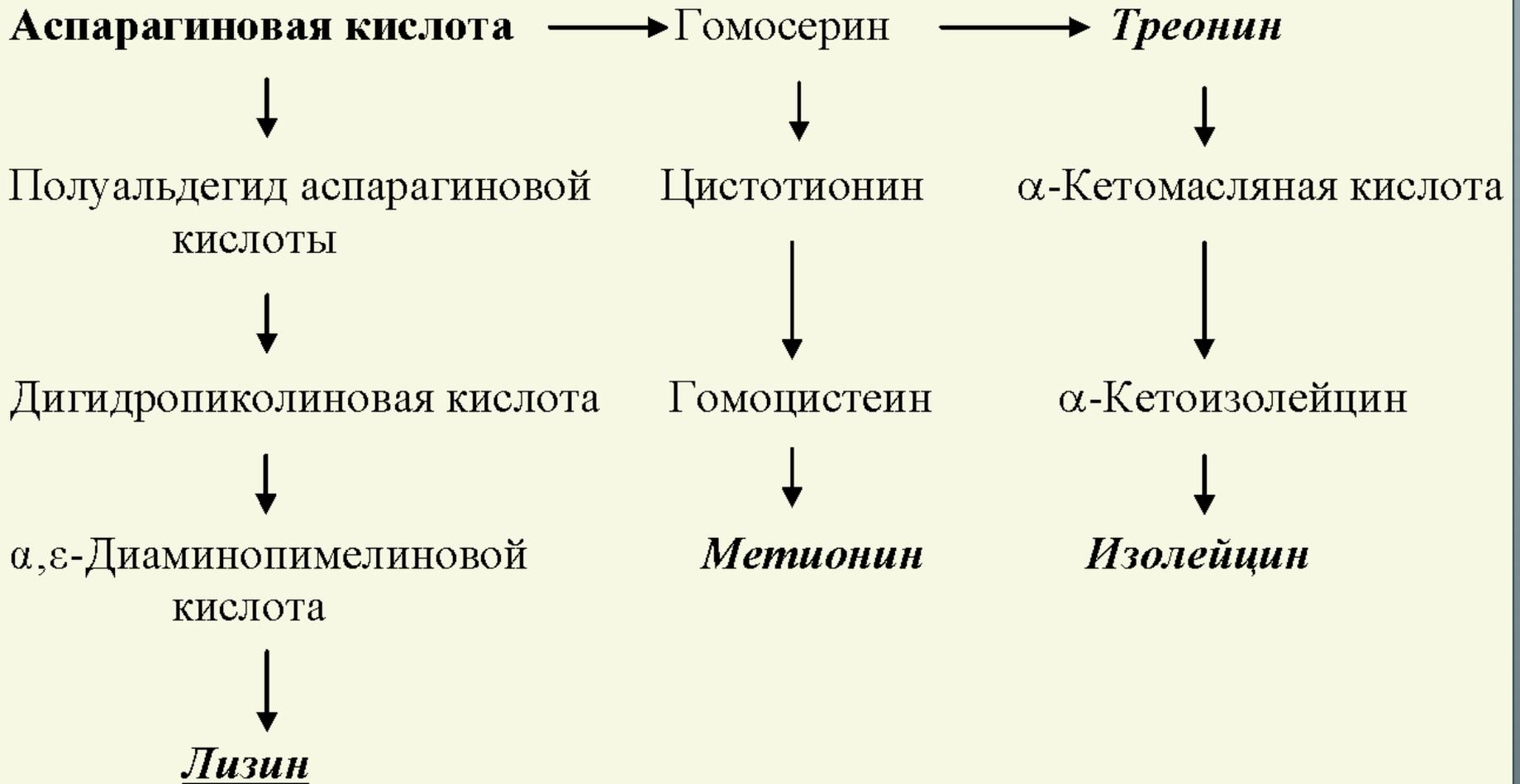
Наиболее дешевым и освоенным способом получения лизина является микробиологический метод.

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*).



**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, мочевины, 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, рН 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 вакуум-выпарной установке до концентрации 40 %. Для предотвращения деградации лизина при нагревании добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до рН 4,5–5,0, в результате образуется соль – моноклоргидрат 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 % моноклоргидрата 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

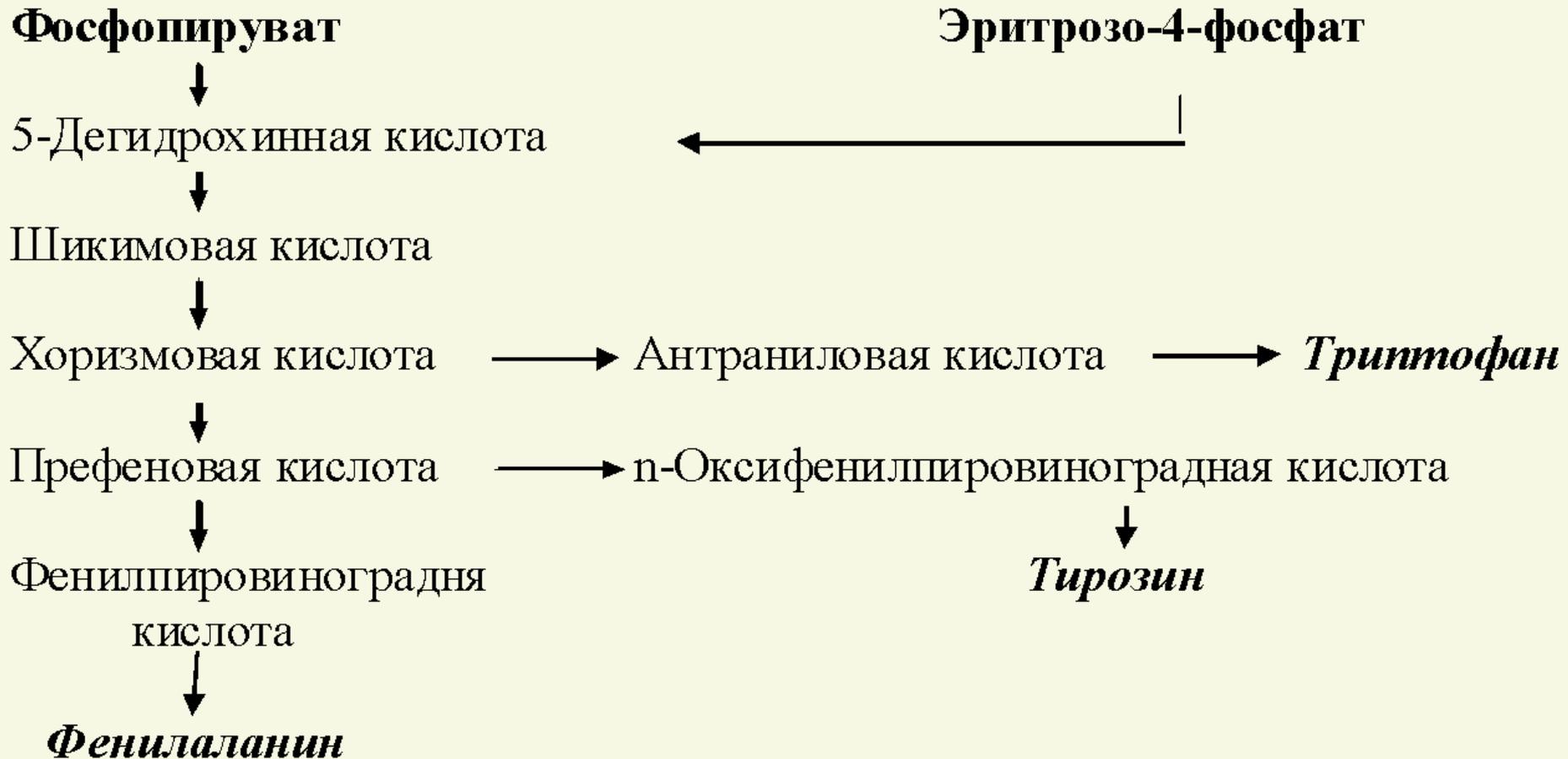
Отсутствие или дефицит **триптофана** в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (диабет, туберкулез, пеллагра).

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:



**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°C**, 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 1 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 анраниловой 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 анраниловой кислоты и 50 % раствор мочевины.

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

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

Длительность ферментации около 120 ч с учетом