ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Первичные метаболиты **(primary metabolite)** [греч. *Metabole* — перемена] – низкомолекулярные соединения (молекулярная масса 2-3 кДа), необходимые для жизнедеятельности клетки. К ним относятся пуриновые и пиримидиновые основания (нуклеотиды), аминокислоты, сахара, органические кислоты, витамины. Эти вещества участвуют в основном обмене веществ, являются коферментами (НАД, НАДФ, ФАД, ФМН), строительными блоками для более сложных соединений (высокомолекулярных).

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

используют в кормопроизводстве (60%)	Изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин, гистидин, аргинин, пролин
в пищевой промышленности (30%)	Цистеин, глицин, глутаминовая кислота
применяют в медицине	Аргинин, аспартат, цистеин, фенилаланин и др.
используют в химической и фармацевтической промышленности	предшественники для производства детергентов, полиаминокислот, полиуретана и препаратов для сельского хозяйства

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Получение аминокислот возможно несколькими путями:

D-изомеры токсичны!

1. **химический синтез** (образуется рацемат),
2. **гидролиз природного белкового сырья** (многоступенчатая и дорогостоящая очистка),
3. **в биотехнологических процессах** (прямая микробная ферментация, микробиологический или ферментативный синтез из предшественников).

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

- **Микробиологический метод** получения аминокислот основан на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты (мг), а в определенных условиях – обеспечивать их сверхсинтез (до 100г/л).
- Биосинтез аминокислот в микробных клетках протекает в виде свободных аминокислот или «пула аминокислот», из которого в процессах конструктивного метаболизма синтезируются клеточные макромолекулы.
- Пути синтеза большинства аминокислот взаимосвязаны. При этом одни аминокислоты являются предшественниками для биосинтеза других. Например, пируват – предшественник аланина, валина, лейцина.
- Синтез каждой аминокислоты в микробных клетках реализуется в строго определенных количествах, обеспечивающих образование последующих аминокислот, и находится под строгим генетическим контролем.
- Контроль осуществляется по принципу обратной связи на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), и на уровне самих ферментов, которые в результате избытка образующихся аминокислот могут изменять свою активность (ретроингибирование).
- Данный механизм контроля исключает перепроизводство аминокислот и также препятствует их выделению из клеток в окружающую среду.

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

В обход природного механизма

используют природные «дикие» штаммы,

изменяют основные факторы среды (концентрация основного субстрата, pH, соотношение макро- и микроэлементов в среде и др.)

Изменение контрольного механизма

осуществляется генетическими методами,

получают мутантные организмы: ауксотрофные и регуляторные мутанты

Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Aerobacter, Microbacterium, Eschirichia

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Промышленные штаммы несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников, их подразделяют на несколько классов:

Природные (дикие) штаммы. Усиливают у них продукцию аминокислот условиями ферментации.

Ауксотрофные мутанты используют в тех случаях, когда необходимо синтезировать аминокислоты, являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций аминокислот. При выращивании такого штамма в среде с минимальной концентрацией необходимого ингредиента (аминокислоты) они способны на суперпродукцию аминокислоты-предшественника.

Мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза (регуляторные мутанты) способны накапливать конечные продукты неразветвленных цепей биосинтеза. Обеспечен биосинтез требуемых аминокислот и подавляется процесс их включения в белки.

Методы генетической инженерии позволяют повышать количество генов биосинтеза путем их клонирования на плазмидах.

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

- Производственные биотехнологические процессы получения аминокислот реализуются в условиях глубинной аэробной периодической ферментации.
- Максимальная продукция аминокислоты наступает, как правило, когда прирост биомассы практически прекращается. Поэтому питательная среда на первом этапе ферментации должна обеспечивать сбалансированный рост клеток; а на втором – условия для сверхсинтеза целевой аминокислоты.
- В качестве источника углерода и энергии используют богатые сахаросодержащие субстраты, главным образом, мелассу. Возможно также привлечение более доступных субстратов (ацетат, сульфитный щелок, углеводороды).
- В качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты и молекулярный азот.
- Периодический режим ферментации и богатая по составу среда требуют соблюдения строгой стерильности в ходе получения инокулята и на ферментационной стадии. Стерилизации подвергаются питательная среда, воздух и все технологическое оборудование.

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

- После стадии ферментации в процессе обработки культуральной жидкости клетки отделяют от раствора, который далее подвергают очистке от окрашенных примесей и взвешенных частиц с помощью сорбционных методов.
- Далее процесс проводится с использованием различных методов выделения и очистки в зависимости от сферы применения конечного продукта.
- Для фармакологии и пищевой промышленности аминокислоты выпускают в виде высушенных чистых кристаллических препаратов.
- Для кормовых и технических целей используют стабилизированную и сконцентрированную культуральную жидкость.

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

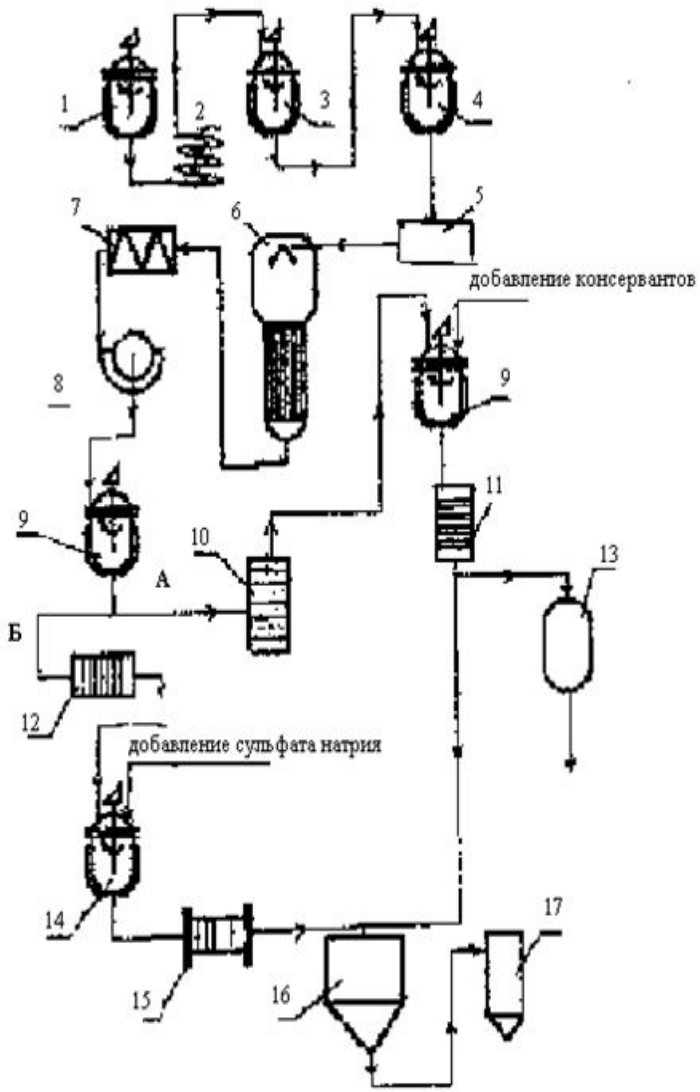


Рис. 1. Примерная технологическая схема получения аминокислоты:

1 – ферментатор; 2 – охладитель; 3 ,9 – рефрижераторы; 4 – емкость для предварительной обработки; 5 – центрифуга; 6 – вакуум-упариватель; 7 – аппарат прямой предобработки аминокислоты; 8 – барабанный фильтр; А, Б – пути (при необходимости смыкающиеся); 10 – аппарат для ультрафильтрации; 11 – емкость для консервации раствора аминокислоты; 12 – мембранный фильтр; 13 – накопитель жидкого концентрата; 14 – емкость для осаждения аминокислоты; 15 – фильтр-пресс; 16 – распылительная сушилка; 17 – накопитель сухого концентрата

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

I ступень

Микроб - продуцент аминокислоты

↓ культивирование в жидкой питательной среде

Биосинтез предшественников аминокислоты и ферментов, катализирующих биосинтез целевого продукта

II ступень

↓ Биосинтез целевого продукта с участием ферментов

Аминокислота - целевой продукт

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Технология получения глутаминовой кислоты

$$HOOC – CH_2 – CH_2 – NH_2CH – COOH$$

Синтез глутаминовой кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот:

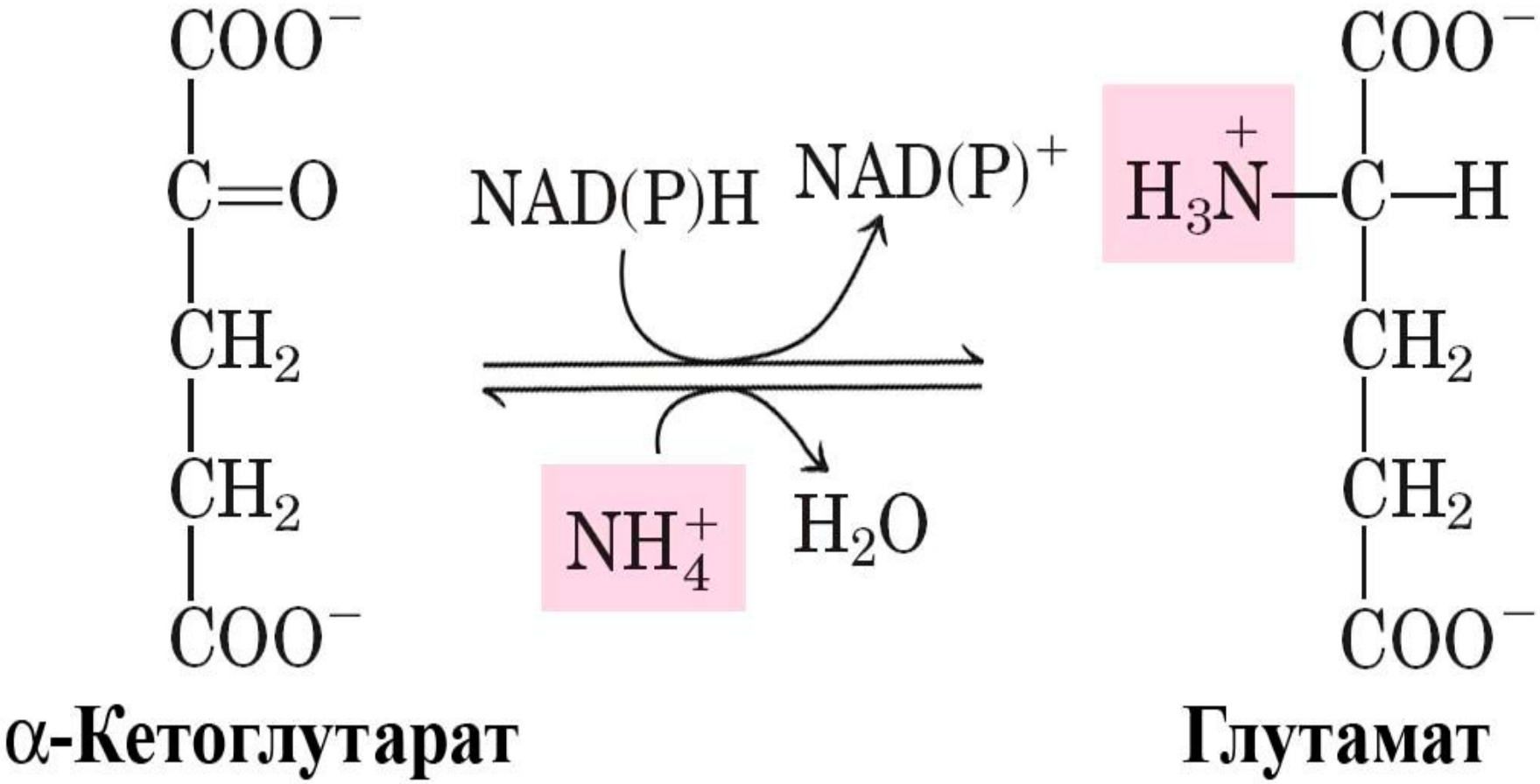
$$HOOC – CH_2 – CH_2 – CO – COOH + НАД(Ф)H_2 + NH_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow HOOC – CH_2 – CH_2 – NH_2CH – COOH + НАД(Ф)$$

Продуценты: *Micrococcus, Brevibacterium, Microbacterium, Corynebacterium*

Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием/или дефектом α-кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту.

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ



ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

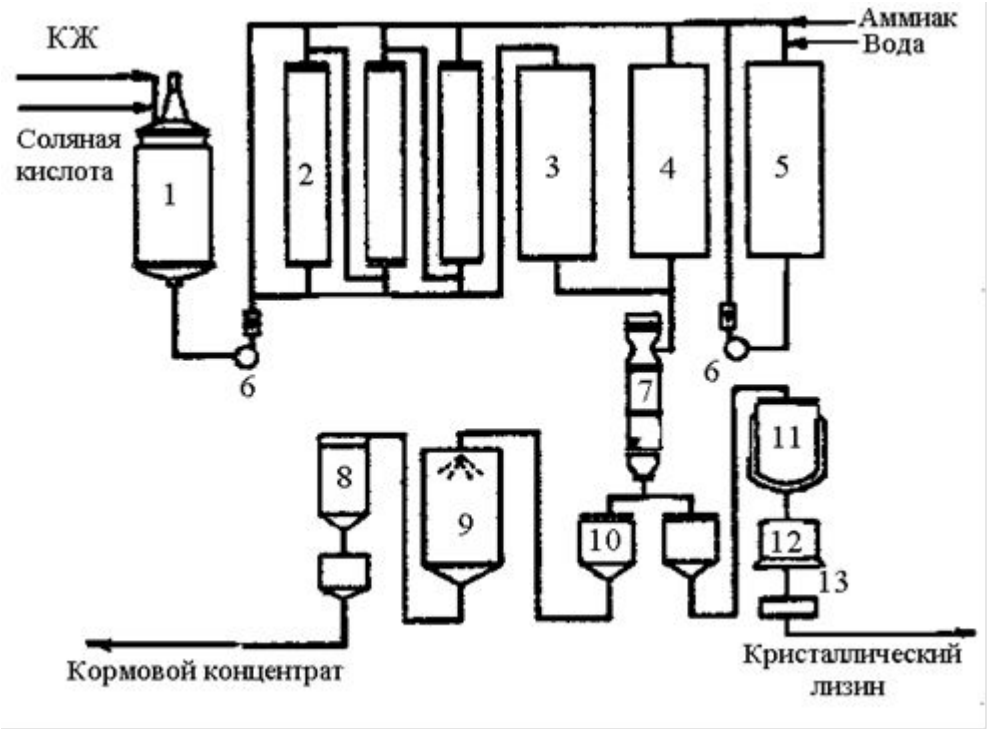


Рис. 2. Технологическая схема получения лизина:

1 – емкость для культуральной жидкости (КЖ); 2 – ионообменные колонны; 3 – сборник элюата; 4 – сборник фильтрата; 5 – емкость для элюата; 6 – насос; 7 – вакуум-выпарной аппарат; 8 – циклон; 9 – сушилка кормового концентрата; 10 – сборник; 11 – реактор-кристаллизатор; 12 – центрифуга; 13 – сушилка