***Лекція 2***

**Технології виробництва амінокислот та білкових препаратів**

**Амінокислоти** — це гетерофункціональні сполуки, які містять у молекулах одночасно карбоксильну (—COOH) і амінну (—NH2) групи.

 Вони є мономерними одиницями білків - завдяки здатності реагувати між собою з утворенням ковалентного пептидного зв’язку формуються пептиди і білки. Порядок включення амінокислот у поліпептидний ланцюг визначається генетичним кодом (через іРНК).

Амінокислоти вирізняються:

а) будовою карбонового ланцюга: розгалужені, нерозгалужені;

насичені, ненасичені; ациклічні, циклічні, ароматичні;

б) наявністю і розміщенням галогенів та інших характеристичних груп (гідроксильної -ОН, сульфанільної-SH, метилсульфанільної -CH3S, дисульфідної -S-S-, амідної (пептидної) тощо);

в) співвідношенням кількості карбоксильних та аміногруп (які визначають pH речовини):

кислі (кількість карбоксильних більша за кількість аміногруп);

нейтральні (кількість карбоксильних дорівнює кількості аміногруп);

основні (кількість карбоксильних менша за кількість аміногруп);

г) полярністю зв’язків бічних ланцюгів (полярні, неполярні);

д) замінністю для людського організму (замінні, незамінні) тощо.

 Всі α-амінокислоти (крім гліцину) мають асиметричний α-вуглецевий атом та існують у двох ізомерних формах. Незамінні амінокислоти не синтезуються в організмах людини та вищих тварин і повинні надходити в організм з продуктами харчування (гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і валін). Дефіцит незамінних амінокислот в організмі призводить до порушень обміну речовин, зупинки росту, зниження маси тіла.

**Білки** – природні полимери, молекули яких побудовані із залишків амінокислот. За будовою білки розділяють на прості та складні.

**Протеїни** - прості білки. До них відносяться альбуміни, глобуліни, глютеміни.

**Протеїди** відносяться до складних білків, які окрім білкових макромолекул містять в своєму складі небілкові молекули. Їх представниками є нуклепротеїди, ліпопротеїди, фосфоліпиди.

 Білки виконуют каталітичну (ферменти), регуляторну (гормони), транспортну (гемоглобін, миоглобін), структурну (колаген, фібрин), двигательну (міозин), захисну (імуноглобулін, інтерферон), запасаючу (казеїн, альбумін), біоенергетичну функції.

Відомі чотири методи отримання амінокислот

* хімічний синтез.
* хіміко-ензиматичний метод
* гідроліз білків рослинного і мікробного походження
* мікробіологічний

Відмінними рисами хімічного методу синтезу ФАР є багатостадійність одержання речовин, необхідність ретельного очищення, невеликі обсяги виробництва, великі асортименти, висока вартість продуктів синтезу.

В кожному синтезі можна виділити такі етапи:

1) вибір джерели сировини (з'єднань - попередників);

2) розробка хімічної схеми синтезу;

3) вибір методу очищення цільового з'єднання;

4) ідентифікація сполук*.*

 Вибір джерел сировини - один з визначальних моментів у синтезі. Для промислового виробництва продуктів тонкого органічного синтезу важливо знайти найбільш зручний, безпечний і дешевий спосіб одержання таких попередників. Важливими джерелами сировини є продукти первинної переробки вугілля, нафти й природного газу. Для одержання БАР часто використовують рослинні й тваринні матеріали переробки лісохімічної, сільськогосподарської й мікробіологічної сировини. Доступність і вартість того самого виду сировини може мінятися із часом внаслідок різних причин, тому при розробці нових синтезів важливо враховувати прогнози по виробництву з'єднань-попередників.

Найбільш складним є створення хімічної схеми одержання речовини. Зазвичай починають із розгляду структури цільового з'єднання й аналізу відомих хімічних реакцій, які можуть привести до нього виходячи з більш простих з'єднань-попередників. При цьому можливі два принципово відмінні підходи. Якщо метод синтезу цільового з'єднання невідомий, у цьому випадку основне завдання полягає в підборі хімічної реакції або сполучення декількох хімічних реакцій. Якщо ж можливі кілька схем синтезу, то завдання зводиться до вибору найбільш раціонального шляху. Тому, в першому випадку завдання більше важке й синтез не завжди закінчується успішно.

Для одержання ФАР хімічним способом використають наступні методи проведення хімічних реакцій:

- перетворення наявних у молекулі заступників (реакції окислювання, відновлення, конденсації);

- введення нових заступників (реакції галогенування, сульфування, нітрування, нітрозування, алкилірування й ацилювання);

- елюмінування заступників для утворення ненасичених зв'язків;

- циклізація шляхом розкриття ненасичених зв'язків або проведенням реакції з виділенням води, спирту, вуглеводнів й ін;

- перегрупування дозволяють одержувати з'єднання з певним розташуванням заступників шляхом зменшення числа вуглеводневих атомів у молекулі або шляхом нарощування числа вуглеводневого ланцюга;

- проведення регіо- або енантіоселективних реакцій пов'язане зі спрямованим впливом на певні реакційні центри шляхом підбора реагентів, умов реакції або зміною механізму реакції.

 Вибір методу очищення цільового з'єднання залежить від агрегатного стану отриманих цільових з'єднань, які можуть містити домішки, що знижують якість отриманого продукту. Для рідких з'єднань очищення проводять шляхом перегонки, ректифікації, молекулярній дистиляції. Кристалічні з'єднання піддають кристалізації з розчинників. Для більш ретельного очищення використовують хроматографічні методи (іонообмінні, на твердих адсорбентах).

 Ідентифікацію цільового продукту проводять для оцінки його якості. Спочатку визначають фізико-хімічні константи (температуру кипіння, температуру плавлення, показник переломлення, щільність і та ін.), потім підтверджують структуру цільового з'єднання спектральними методами (УФ, ІК-, ЯМР), мас-спектроскопією, рентгеноструктурним аналізом.

Хімічний синтез амінокислот достатньо ефективний, надає можливість організувати виробництво з високим рівнем автоматизації. У промисловому масштабі розроблено і реалізовано виробництво багатьох амінокислот методом органічного синтезу — метіоніну, лізину, глутамінової кислоти, триптофану, гліцину тощо.

За сучасними технологіями здійснюється також синтез індивідуальних амінокислот з високим виходом і високим ступенем очищення. Однак цей метод має низку суттєвих недоліків - сучасними методами тонкого органічного синтезу можна одержати D- і L-форми амінокислот у будь-яких кількостях, однак вони знаходяться у вигляді рацематів, тобто рівних за масою сумішей L- і D-амінокислот. У хімічних реакціях ці ізомери не відрізняються один від одного, але в організмі тварин (людей) використовується тільки L-амінокислота. Другий ізомер (D-амінокислота) не має біологічної активності і тому не може брати участі в біосинтезі білка, а деякі D -амінокислоти мають токсичні властивості. Винятком є гліцин і метіонін. Для першого не існують оптично активні ізомери, а у другого D- та L-форми засвоюються організмом людини і тварини однаково.

Виробництво амінокислот методом органічного синтезу передбачає здійснення великої кількості технологічних операцій. Реалізація практично кожної з них вимагає певного обладнання. Технологія такого виробництва у більшості випадків направлена на використання достатньо токсичних речовин, високо очищених реагентів і здійснення стадії розділення рацематів, що утворюються.

Методи розділення рацемічної суміші, у свою чергу, досить складні і потребують значних витрат, а в окремих випадках для деяких амінокислот їх взагалі не розроблено. З існуючих методів розділення рацемічної суміші на

складові ізомери найбільш придатним є ферментативний метод, що ґрунтується на використанні пліснявої аміноацилази.



Як вихідну сировину використовують ацильовані D-, L-ізомери амінокислоти, одержані за допомогою хімічного синтезу, і впливають на них аміноацилазою. Фермент вибірково гідролізує тільки ацил-L-ізомер, відщеплюючи від нього об’ємну ацильну групу. В результаті утворюється відповідна L-амінокислота, якамає вищу розчинність, ніж ацил-D-ізомер, що залишився нерозщепленим у розчині. В результаті ферментативного гідролізу утворюється суміш, яка складається із L-амінокислоти і ацил-D-ізомера амінокислоти. Вона легко розділяється, оскільки її компоненти мають різну розчинність, і виділяється L-амінокислота. Ацил-D-амінокислота, яка залишається, при підігріванні рацемізується, тобто знову переходить у суміш ацильованих L, D-амінокислот і процес повторюється спочатку. Таким чином, єдиним продуктом є L-амінокислота. Оскільки аміноацилаза має чітку специфічність лише до будови ацильної частини і слабку специфічність щодо будови бічного ланцюга амінокислоти, вона може бути використана для розділення багатьох амінокислот

Хіміко-ензиматичний метод (ензиматична трансформація хімічно синтезованих попередників амінокислот з утворенням біологічно активних L-ізомерів). Метод достатньо дорогий.

Як приклади використання хіміко-ферментного методу можна навести:

• синтез аспарагінової кислоти з фумаровой (використовуються клітини Escherichia coli)

• синтез L-фенілаланіну з коричної кислоти (використовуються клітини дріжджів).

Третій, біологічний метод - застосування гідролізу білоквмісних субстратів. При гідролізі відходи харчової та молочної промисловості нагрівають з розчинами кислот або лугів при 100-105 ⁰С протягом 20-48 год. Найчастіше використовують 20% р-р соляної к-ти, що забезпечує глибокий гідроліз білка.

****

Найкращим способом зменшення втрат білка при гідролізі є проведення його в вакуумі або в атмосфері інертного газу, а також дотримання високого співвідношення кількості кислоти, взятої для гідролізу і маси білка (200: 1). Раніше методом гідролізу отримували амінокислоти виключно для фармацевтичних і наукових цілей. Зараз сфера використання білкових гідролізатів істотно розширилася. Їх застосовують в медицині, тваринництві, харчовій та мікробіологічної промисловості.

Основні технологічні стадії **мікробіологичного синтезу** традиційні:

* предферментація;
* ферментація

Предферментація включає

1. приготування та подготовку средовища;
2. отримання та подготовку посівного материалу;
3. вибір и подготовку обладнання.

Розглянемо способи отримання амінокислот на прикладі **L-лізіну:**

1. **Хімічний метод.**

І етап:



ІІ етап:



1. **Хіміко-ензиматичний метод**



1. Мікробіологічний метод: підготовка поживних субстратів і їх стерилізація, вирощування посівного матеріалу, ферментація, зневоднення продуктів ферментації шляхом вакуумного випарювання з подальшим висушуванням упареного розчину у розпорошувальній сушарці або видалення кристалічного лізину.

Основною сировиною для виробництва кормового лізину є патока і кукурудзяний екстракт. Культивування продуцентів і біосинтез лізину проводиться у промислових біореакторах (ферментерах) об’ємом 50, 63 і 100 м3. Після закінчення ферментації готова культуральна рідина містить, крім лізину й інших продуктів метаболізму, біомасу продуцента і залишки поживного середовища. Вміст сухої речовини у ній становить 10–13 %, лізину 2–3 % і 0,8–1,8 % бактеріальної біомаси.

Залежно від конкретної мети виробництва на основі культуральної рідини можна одержати такі препаративні форми лізину: рідкий концентрат лізину, сухий кормовий концентрат лізину, а також висококонцентровані кормові і високоочищені кристалічні препарати для харчової і медичної промисловості. Рідкий концентрат лізину отримують шляхом стабілізації культуральної рідини без відокремлення біомаси продуцента з подальшим вакуум-випарюванням до 35–40 % сухих речовин. Вміст лізину в ньому складає 7–12 %. Сухий кормовий концентрат лізину одержують шляхом

зневоднення рідкого концентрату. Він містить лізину від 10 до 20 %, залежно від використання наповнювачів. Кристалічні препарати лізину одержують з культуральної рідини після відокремлення бактеріальної біомаси з вмістом

97–98 % L-лізину. Ці товарні форми, окрім лізину, і інші біологічно активні речовини – вітаміни В1, В2, В3, В4, РР тощо, які підвищують цінність кормових добавок.

Досягнення молекулярної генетики та генетичної інженерії створили реальні передумови для заміни традиційних методів селекції продуцентів амінокислот методами конструювання штамів, що включають клонування окремих генів, їх ампліфікацію на багатокопійних плазмідах, заміну промоторів з метою підвищення експресії гена та сайтспецифічний мутагенез.