

## ЛЕКЦІЯ 5

### Тема: Промислове виробництво амінокислот і органічних кислот

#### План

1. Біосинтез амінокислот.
2. Промислове виробництво органічних кислот.

#### 6.1. Виробництво амінокислот

Амінокислоти широко використовують як добавки до продуктів харчування, приправи, підсилювачі смаку, добавки до кормів, а також як сировину для фармацевтичної і парфюмерної промисловостей. Усі амінокислоти, з яких складаються білки, є L-формами. З 20 амінокислот 8 (ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін) є незамінними для людини. Для сільськогосподарських тварин цей список доповнюють гістидин і аргінін, а для молодняка птиці – ще й пролін.

Одержання амінокислот можливе декількома способами: хімічним синтезом, гідролізом природної білкової сировини і в біотехнологічних (мікробіологічних) процесах. Сучасними методами хімічного синтезу можна синтезувати D- і L-ізомери амінокислот, проте D-ізомери амінокислот не засвоюються організмом людини і можуть бути токсичними. Мікроорганізми синтезують тільки L-ізомери амінокислот. Біотехнологічні процеси включають як пряму мікробну ферментацію, так мікробіологічний або ферментативний синтез із попередників.

На сучасному етапі в практику впроваджують комбіновані хіміко-мікробіологічні способи одержання амінокислот. Спочатку хімічним синтезом одержують суміш D- і L-ізомерів амінокислот, яку пропускають через колонки з іммобілізованими мікробними ізомерами, які перетворюють D-ізомери в L-ізомери. Вибір способу одержання продукту залежить від економічної ефективності.

#### Біосинтез глютамінової кислоти

**Глутамінова кислота** не належить до незамінних амінокислот, але на її основі відбувається синтез багатьох фізіологічно активних сполук, необхідних для нормального функціонування організму людини і тварин. Це перша амінокислота, яку отримали за допомогою мікробіологічного синтезу.

Глутамат натрію широко застосовують як смакову речовину в харчовій промисловості і кулінарії.

Продуцентами L-глутамінової кислоти є бактерії родів *Corynebacterium* (*C. glutamicum*), *Brevibacterium* (*B. flavum*) та деякі штами із родів *Micrococcus*, *Microbacterium*.

Надсинтез у «диких» штамів зумовлений особливими фізіологічними умовами, коли ріст клітин гальмується. Такі умови для *Corynebacterium glutamicum* створюються при дефіциті в середовищі біотину, або в присутності деяких антибіотиків і детергентів. При цьому в клітинній стінці відбуваються структурні і функціональні зміни, які призводять до їхньої надмірної проникності й виділення глютамінової кислоти в середовище (до 50 % використаного джерела вуглецю).

В основі біосинтезу глютамінової кислоти лежать два біохімічних принципи:

1. нестача ферменту  $\alpha$  - кетоглутаратдегідрогенази;
2. блокування біосинтезу біотину.

Селекційна робота з продуцентами проводиться в таких напрямках:

- одержання мутантів зі зниженою  $\alpha$  -кетоглутаратдегідрогеназною активністю;
- одержання регуляторних мутантів зі зниженою чутливістю ферменту L-глутаматдегідрогенази до інгібування кінцевим продуктом;

- одержання мутантів, здатних утворювати амінокислоту в присутності надлишку біотину.

При біосинтезі глутамінової кислоти безпосереднім метаболітом-попередником є 2-оксоглутарат, який утворюється в циклі трикарбонових кислот (ЦТК).

При промисловому культивуванні ростучих культур клітин-продуцентів глутамінової кислоти джерелом вуглецю є меляса або гідролізати крохмалю. Джерелом азоту є сечовина, рідше амоній хлорид або сульфат, рН розчину має бути у межах 6,8–7,8. Дефіцит азоту в середовищі знижує вихід глутамінової кислоти і сприяє нагромадженню у великій кількості  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти.

Всі продуценти глутамінової кислоти є біотинзалежними, а деякі з них і тіамін залежні, проте, кількість вітамінів не повинна перевищувати 2-5 мкг/л середовища, адже висока концентрація цих вітамінів занадто стимулює ріст клітин, сприяє підвищеному синтезу аланіну, молочної, янтарної, аспарагінової кислот, а вихід глутамінової кислоти значно знижується.

У Японії одержують глутамінову кислоту на мелясних середовищах за допомогою мутантів, у яких нагромадження амінокислоти контролюється температурним режимом (вихід глутамату 20–26 г/л).

Схема отримання глутамінової кислоти на середовищі з глюкозою або з гідролізованим крохмалем:

1. Культивування. Здійснюють у ферментері, після чого біомасу видділяють від культуральної рідини центрифугуванням, потім проводять вакуум-випаровування до вмісту сухих речовин 40–50 %.

2. Кристалізація глутамінової кислоти. При цьому концентрат підкислюють хлоридною кислотою до рН 3,2; охолоджують до  $-15^{\circ}\text{C}$  і відділяють кристали глутамінової кислоти зі ступенем чистоти 80 %.

3. Повторна кристалізація (отримані кристали розчиняють у воді (1:5) і фільтрують, отримують глутамінову кислоту зі ступенем чистоти 99 %. Готовий продукт висушують.

### Біотехнологія отримання лізину

**Лізин** в організмі людини і тварин не синтезується, але він є не тільки структурним елементом білка, але й виконує ряд найважливіших біохімічних функцій: сприяє секреції травних ферментів, є попередником каротину та оксилізину, забезпечує транспортування кальцію і стронцію в клітини, поліпшує загальний баланс азоту в організмі, визначає біологічну цінність білка тощо.

Синтез L-лізину у мікроорганізмів здійснюється різними шляхами. Дріжджі, гриби і мікроводорості синтезують лізин з  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти через  $\alpha$ -аміноадипінову кислоту.

У бактерій біосинтез L-лізину здійснюється із аспарагінової кислоти (аспартату) через  $\alpha$ -діамінопімілінову кислоту. Крім L-лізину, за розгалуженим шляхом з аспартату утворюються також L-метіонін, L-треонін і L-ізолейцин (рис. 6.1).



Рисунок 6.1 – Схема біосинтезу лізину у бактерій через діамінопімелінову кислоту.

Контроль за біосинтезом амінокислот групи аспартату здійснюється ферментом  $\beta$ -аспартаткіназою. Продукенти лізину *B. flavum* і *C. glutamicum* – мають одну  $\beta$ -аспартаткіназу, активність якої регулюється шляхом **узгодженого інгібування** за принципом зворотного зв'язку треоніном і лізином. Синтез лізину каталізує фермент дигідропіколінатсинтетаза. Спільним попередником у синтезі лізину і треоніну є напівальдегід аспарагінової кислоти (семіальдегід). У деяких штамів коринебактерій він використовується головню для синтезу треоніну, оскільки активність гомосериндегідрогенази у 15 разів вище, ніж активність дигідропіколінатсинтетази. Біосинтез лізину починається після насичення клітин треоніном, метіоніном і ізолейцином. У зв'язку з цим для отримання клітин, здатних до надсинтезу лізину, необхідно заблокувати біосинтез зазначених метаболітів шляхом зниження активності гомосериндегідрогенази або гомосеринкінази. Таким чином, усувається накопичення гомосерину, треоніну і метіоніну. Якщо до середовища додати в необхідних для росту культури дозах треонин, метіонін або гомосерин, то відбувається інтенсивний синтез лізину.

Промислові штами-продукенти лізину – це ауксотрофні штами глутаматсинтезуючих коринебактерій (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*). Використовують три типи ауксотрофних мутантів:

1. Гомосеринові ауксотрофи з відсутньою активністю гомосериндегідрогенази.
2. Треонінові ауксотрофи, у яких пригнічена активність гомосериндегідрогенази.
3. Метіонін і треонінчутливі прототрофні штами *B. flavum*, у яких активність гомосериндегідрогенази знижена в 20–50 разів, але цей фермент забезпечує потреби клітин у гомосерині.

Створено штами р. *Brevibacterium*, що здатні забезпечувати 40 % конверсію субстрату в амінокислоту і вихід лізину на мелясних середовищах до 40-50 г/л, а на середовищах з оцтовою кислотою – до 70 г/л.

Існує два способи біотехнологічного процесу отримання лізину за допомогою мікроорганізмів:

- одноетапний спосіб – це вирощування мікроорганізмів із надсинтезом лізину;
- двоетапний – передбачає використання синтетичних попередників, одержаних хімічним або біологічним методами та виділення ферментів, за допомогою яких здійснюється біотрансформація, другий етап – власне процес трансформації.

**Схема отримання лізину на мелясному середовищі:**

1. Середовище для одержання лізину готується із меляси, кукурудзяного екстракту, солей амонію, одно- і двозаміщеного фосфату калію. Кукурудзяний екстракт іноді замінюють дріжджовим гідралізатом, концентратом клітинного соку картоплі або витяжкою із пшеничних висівок. Після стерилізації таке середовище використовують для вирощування посівного матеріалу і для головної ферментації.

2. Спочатку культуру розмножують у колбах на качалках, потім у ферментерах об'ємом 100 і 3000 л. Кількість посівного матеріалу 5–10 % оптимальна температура 30–35<sup>0</sup> С і рН 7,4. Тривалість ферментації для кожної стадії близько 24 години. Головна ферментація триває 50–70 годин при аналогічних режимах. Концентрація лізину в розчині 20–60 г/л, концентрація клітинної біомаси 15–20 г/л у перерахунку на суху масу. Високу концентрацію лізину 60–80 г/л можна одержати на мелясному середовищі, якщо під час ферментації вводити дробну підкормку частиною живильного середовища при дотриманні точної регуляції культивування. Мелясу можна замінити сахарозою, соком цукрового буряка, глюкозою або гідролізатом крохмалю, а також оцтовою кислотою і підняти концентрацію лізину до 100 г/л.

3. Для одержання кристалічного лізину клітинну масу центрифугують, а культуральну рідину пропускають через катіоніт КУ-2 або КВ-4-Р-2.

Лізін елююють 2,0–3,5 % розчином. Елюат упарюють у вакуумі при температурі 60<sup>0</sup> С до 1/20 – 1/70 частини вихідного об'єму, потім, за допомогою НСІ встановлюють рН 4,5–5,0; охолоджують до 14–18<sup>0</sup>С і кристалізують.

4. Після фільтрації і центрифугування кристалів одержують технічний лізін – 94–96 % лізину монохлоргідрат. Для одержання чистого лізину кристали технічного лізину піддають нагріванню в невеликій кількості води 70<sup>0</sup> С, додають активоване вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою НСІ встановлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при 60<sup>0</sup>С. Одержаний лізін містить 99,9 % лізину монохлоргідрату, і 0,1 % золи і не більше 0,001 % солей важких металів.

Для кормових потреб одержують концентрат лізину. Концентрат лізину можна використовувати в рослинництві як стимулятор росту культурних рослин і атрактант ґрунтових шкідників насіння.

## 6.2. Промислове виробництво органічних кислот

Органічні кислоти використовують у харчовій і фармацевтичній, у техніці і в якості хімічної сировини. Деякі органічні кислоти отримують шляхом екстракції з природної рослинної сировини (лимонну, яблучну); інші (молочну, оцтову) – у процесах органічного синтезу. На сьогодні в промислових масштабах мікробіологічним шляхом можна отримувати понад 50 органічних кислот, проте отримують близько 20 кислот. Для технічних потреб органічні кислоти отримують хімічним шляхом; кислоти, які використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловості – у різних біотехнологічних процесах. До таких належить виробництво лимонної, ітаконової, пропіонової, глюконової кислот; молочна і оцтова кислоти виробляються мікробіологічним і хімічним шляхами.

Біотехнологія отримання органічних кислот налагоджена в багатьох країнах. Продуцентами є різні штами плісневих грибів і бактерій. Сировиною для виробництва органічних кислот є сахароза та глюкоза, відходи різних виробництв (бурякова і тростинова меляси, гідролізати деревини, крохмалевмісні матеріали).

Мікробіологічні процеси одержання органічних кислот поділяють на дві групи:

- 1) анаеробні (молочна, пропіонова);
- 2) аеробні (оцтова, лимонна, ітаконова, глюконова).

Всі органічні кислоти є проміжними або кінцевими продуктами метаболізму. Основним механізмом регуляції їх утворення є лімітація росту продуценту факторами середовища. Наприклад, утворенню таких органічних кислот, як глюконова,  $\alpha$ -кетоглутарова сприяє лімітація росту культур по азоту, тобто при надлишку в середовищі джерела вуглецю.

При одержанні лимонної кислоти на вуглеводному середовищі важливе значення має лімітація росту продуцентів по залізу і фосфору. У мелясі є багато заліза, яке на стадії приготування живильного середовища осаджують за допомогою жовтої кров'яної солі.

Для аеробних процесів факторами, що лімітують ріст може бути ступінь аерації і рН середовища. Аеробні процеси реалізують як глибинним, так і поверхневим способом ферментації, анаеробні – тільки глибинним.

### Виробництво оцтової кислоти і оцту

**Оцтова кислота** – широко використовується у харчовій, хімічній, мікробіологічній промисловості, у медицині.

Оцет у вигляді переокислого вина був відомий за 7 тис. років до нашої ери, але тільки у 1986 році Л. Пастер установив фізіологічну природу оцтовокислого бродіння, який можна викликати за допомогою оцтовокислих бактерій.

Оцтовокисле бродіння засновано на здатності оцтовокислих бактерій окислювати спирт за участі алкогольдегідрогенази до оцтової кислоти. Цей процес може бути реалізований багатьма оцтовокислими бактеріями, проте в промислових технологіях для одержання оцту використовують бактерії роду *Acetobacter*.

**Оцет** – це продукт, який містить не менше 4 % (маса/об'єм) оцтової кислоти у воді. Більшу частину оцту отримують, використовуючи розведений спирт. Процес виробництва реалізують як поверхневим, так і глибинним способами. Є два способи промислового одержання оцту:

- повільний (французький) – оцет одержують з легкого вина;
- швидкий (німецький) – зі спирту.

Щоб оцтовокисле бродіння проходило нормально, потрібно щоб цукор був перетворений в етанол, тому оцтовокислому бродінню передуює спиртове, але не з тими штамми, що використовуються у виробництві етанолу. У виробництві оцту спиртове бродіння краще за все здійснюють селекційні штами винних дріжджів (*Saccharomyces ellipsoideus*), які крім етанолу синтезують побічні продукти метаболізму, що поліпшують смак і аромат оцту.

Оцет, одержаний мікробіологічним шляхом (харчова оцтова кислота, столовий оцет), як і вино, розрізняють за сортами в залежності від зброджуваного субстрату. Відомі яблучний, виноградний, грушевий та інші сорти оцту, також бальзамічний оцет. Оцет, одержаний при бродінні, має приємний аромат і смак, які обумовлені побічними продуктами бродіння: складними ефірами (етилацетат та ін.), вищими спиртами, органічними кислотами.

Оцтова кислота була першим мікробіологічним продуктом, одержаним за допомогою іммобілізованих клітин. Протягом довгого часу застосовується адсорбування оцтовокислих бактерій на деревній стружці, деревному вугіллі, коксі та інших субстратах.

Пропускаючи розчин етанолу через генератори з іммобілізованими бактеріями, одержують 10-15 % розчин оцтової кислоти. Зі 100 літрів безводного етанолу теоретично може бути одержано 103 літри оцтової кислоти. На практиці зі 100 літрів етанолу вихід оцту рідко перевищує 90 літрів, що пов'язано з переокисленням і неповним окисленням етанолу оцтовокислими бактеріями, а також із його випаровуванням. Щорічно у світі виробляють 100 тис. т оцтової кислоти (половину одержують хімічним шляхом у вигляді технічної оцтової кислоти).

Оцтову кислоту широко використовують у харчовій промисловості. Технічну оцтову кислоту використовують для виробництва ацетону, ацитилену, синтетичних барвників, медичних препаратів (аспірин, антипірін, фенацетин), ароматизованих речовин (кумарин, ванілін), а також як субстрат для мікробіологічної біотрансформації.

Ферментацію сахарозних середовищ реалізують за допомогою двох стадій: на першій стадії за допомогою дріжджової інвертази одержують інвертазний цукор; на другій, за допомогою *Acetobacter xylinum* – оцтову кислоту. Друга стадія триває 60 годин, за цей час

вуглеводи (їх міститься 6 %) зброджуються, рН зменшується до 2, на поверхні рідкої фази утворюється продукт – біофільм.

Встановлено, що продуцент оцтової кислоти із роду *Acetobacter*, розвиваючись на поверхні середовища, утворює слизову плівку, яка складається із целюлози (на 90 %) і клітин бактерій. Якщо цю плівку зняти, висушити і відповідно обробити, можна одержати досить міцні біофільми медичного призначення. Якщо опікові рани покрити таким біофільмом, вони загоюються протягом 7–8 діб.

### Одержання лимонної кислоти

**Лимонна кислота** – трьохосновна оксикислота, що міститься в деяких ягодах і фруктах, особливо в цитрусових. Лимонну кислоту завдяки її смаковим і фізико-хімічним властивостям широко використовують у харчовій промисловості при виготовленні кондитерських виробів і напоїв, а також як консервант; у фармацевтичній промисловості, при переливанні крові, для виготовлення косметичних засобів, у хімічній і текстильній промисловості. Світове виробництво лимонної кислоти становить понад 300 тис. т у рік.

Головним продуцентом у промисловому виробництві лимонної кислоти є штами плісеневих грибів *Aspergillus niger*, а також *A. wentii*.

У виробництві лимонної кислоти застосовують три способи ферментації: культивування продуцентів на поверхні твердого середовища; поверхневе культивування на рідкому середовищі; глибинне культивування.

Технологія виробництва лимонної кислоти з меляси:

1. У окремому цеху вирощують посівний матеріал у вигляді спор (конідій) *Aspergillus niger*, потім розмножують його в три стадії – у пробірках, колбах і алюмінієвих кюветках. Тривалість кожної стадії 2–4 доби при температурі 32<sup>0</sup>С. Для вирощування в пробірках використовують тверде агаризоване сушло-середовище, для вирощування в колбах і кюветках – рідке поживне середовище. Під час культивування на поверхні розчину утворюється щільна плівка міцелію, яка потім вкривається конідіями. На останній стадії вирощування дозрілі й підсушені конідії збирають із кювет за допомогою спеціального вакуумного насоса. Для збільшення терміну зберігання конідії змішують з активованим вугіллям після висушування. Їх можна зберігати в такому вигляді 1–2 роки. З 10 дм<sup>2</sup> площі кювет можна одержати 3–4 г сухих конідій (площа 1-ї кювети дорівнює 8,5 дм<sup>2</sup>). Такий посівний матеріал є комерційним препаратом.

2. Лимоннокисле бродіння відбувається в камерах при 34–35<sup>0</sup>С. На полицях розміщують металеві кислотостійкі кювети висотою 7–10 см, при висоті шару, який живиться 6–12 см. До кожної з них подається свіже живильне середовище і від кожної після зброджування відводиться маса. У камері передбачена система стерильного кондиціонування повітря, яке рівномірно розподіляється по всьому об'єму середовища.

При роботі за безобмінним методом цикл бродіння закінчується через 6–8 діб. Максимальне кислотоутворення відбувається на 5-ту добу 100 г /м<sup>2</sup>/г.

Продуктивність бродильних камер можна збільшити, додаючи до міцелію свіже живильне середовище. Це можна здійснити двома методами:

1) **обмінний метод**. Він полягає в тому, що після видалення із кювет збродженого розчину і промивання міцелію стерильною водою під плівку заливають свіже стерильне середовище і продовжують процес зброджування.

2) **метод доливок**. Цей метод полягає в тому, що через 3–4 доби культивування, коли початкова концентрація цукрів із 7–10 % зменшується до 3–4 % в результаті зменшення об'єму живильного середовища, під плівку міцелію доливають свіжий розчин меляси в кількості 30–35 % від початкового об'єму. Таким чином, у ході одного циклу вдається переробити на 30–40 % більше живильного середовища.

3. У кінці бродіння культуральну рідину зливають, міцелій промивають і після висушування використовують для потреб тваринництва або для одержання ферментного

препарату – пектинази. У 1 літрі культуральної рідини міститься приблизно 40–50 г/л лимонної кислоти, 3 г глюконової кислоти, 1 г шавлевої кислоти і 7 г незброженого цукру. Лимонна кислота складає 90 % від загальної маси. Її виділяють із розчину хімічним шляхом.

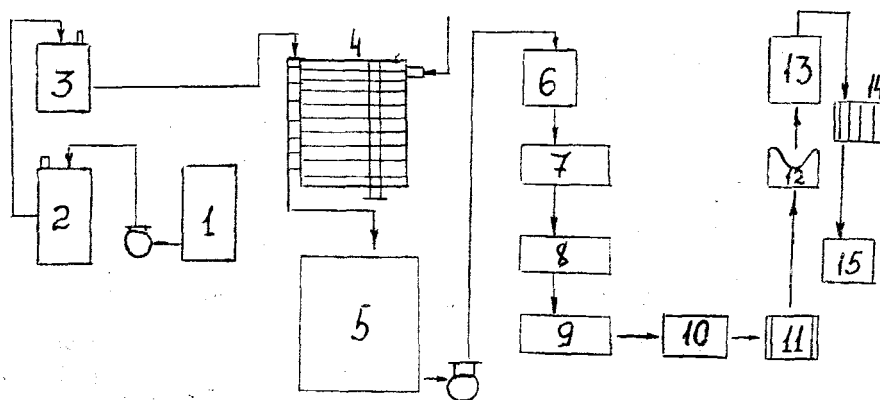


Рисунок 6.1 – Апаратурно-технологічна схема одержання лимонної кислоти:

- 1 – сховище меляси; 2 – ємність для розчинення меляси; 3 – стерилізатор; 4 – камера для бродіння; 5 – збірник зброженої рідини; 6 – нейтралізатор; 7 – фільтр; 8 – вакуум-випарювальний апарат; 9 – збірники; 10 – повторювальний розчинник; 11 – фільтр-прес; 12 – кристалізатор; 13 – центрифуга; 14 – сушарка; 15 – збірник.

Розроблено метод одержання лимонної кислоти з *n*-парафінів за допомогою *Candida lipolytica*. Це процес глибинної ферментації. Вихід лимонної кислоти складає 130–140 % від концентрації внесених парафінів. Вихід лимонної кислоти при переробці вуглеводів складає 85 %. Однак останнім часом найбільшого поширення отримала технологія синтезу лимонної кислоти з меляси.

### Виробництво яблучної кислоти

**Яблучна кислота** – дикарбонова оксикислота, яку використовують як підкислювач у харчовій промисловості. Її можна одержати з фумарової кислоти або шляхом ферментації за участю мікроорганізмів роду *Paracolobactrum*, або за допомогою іммобілізованої фумарази. Описані також способи одержання яблучної кислоти з *n*-парафінів за допомогою дріжджів.

Як відомо, у результаті хімічного синтезу утворюється рацемічна суміш DL-яблучної кислоти. L-ізомер яблучної кислоти почали одержувати із фумарової кислоти за допомогою іммобілізованої фумарази. Цей фермент каталізує приєднання до фумарової кислоти по подвійному зв'язку молекули води з утворенням L-яблучної кислоти. Для цих цілей потрібно не ізольований фермент, а клітини, що містять фумаразу.

Фірма “Танабе Сейяку” (Японія) у ролі носія клітин використовує гель карагінану – полісахарид морських водоростей. Гранули іммобілізованих клітин занурюють у колонку, через яку пропускають розчин фумарової кислоти, при виході із колонки в розчині знаходиться L-яблучна кислота. Період напівінактивації ферменту 160 діб.

#### Питання для самоконтролю:

1. Які мікроорганізми використовують при промисловому виробництві амінокислот?
2. У чому полягає перевага мікробного синтезу амінокислот над хімічним?
3. Назвіть галузі, де використовують амінокислоти.
4. Які органічні кислоти одержують за допомогою мікробного синтезу?
5. Назвіть продуцентів органічних кислот, що використовують у промисловості.

6. Яким способом одержують лимонну кислоту?
7. Які особливості технології виробництва оцтової кислоти і оцту?