

Лекція 6.

Тема: Промислове виробництво амінокислот, органічних кислот, розчинників.

План.

1. Біосинтез амінокислот.
2. Біотехнологія отримання кормового лізину.
3. Промислове виробництво органічних кислот.
4. Використання мікроорганізмів для отримання розчинників

Біотехнологічна промисловість умовно поділяється на крупнотонажне виробництво і виробництво продуктів тонкого синтезу.

Виробництво етанолу, кормових і пекарських дріжджів, органічних кислот, органічних розчинників, полісахаридів і ферментів відносять до крупнотонажних виробництв. До цієї групи можна приєднати одержання фруктозної патоки за допомогою ферментів.

До тонкого синтезу відноситься, перш за все, виробництво антибіотиків, гормонів, медичних (очищених) ферментів, фармацевтичних препаратів, а також різноманітних біохімічних реактивів.

1. Отримання амінокислот.

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 *Corynebacterium* (*C.glutamicum*), *Brevibacterium* (*B.flavum*) та деякі штами із родів *Micrococcus*, *Microbacterium*,

В основі біосинтезу її лежить два біохімічних принципи:

1. нестача ферменту α - кетоглутаратдегідрогенази;
2. блокування біосинтезу біотину.

Надсинтез у «диких» штамів зумовлений особливими фізіологічними умовами, коли ріст клітин гальмується. Такі умови у *Corynebacterium .glutamicum* створюються при дефіциті у середовищу біотину, або у 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 у середовище (до 50% використаного джерела вуглецю).

Селекційна робота з продуцентами проводиться у таких напрямках:

- одержання мутантів зі зниженою α -кетоглутаратдегідрогеназною активністю;
- одержання регуляторних мутантів зі зниженою чутливістю ферменту L-глутаматдегідрогенази до інгібування кінцевим продуктом;
- одержання мутантів, здатних утворювати амінокислоту в присутності підвищених кількостей біотину.

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

При промисловому культивуванні ростучих культур клітин-продуцентів глютамінової 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 глютамінової кислоти і сприяє нагромадженню у великій кількості α -кетоглутарової кислоти.

Всі продуценти глютамінової кислоти біотин залежні, а деякі тіамін залежні. Висока концентрація цих вітамінів занадто стимулює ріст клітин, сприяє підвищеному синтезу аланіну, молочної, янтарної, аспарагінової кислот, а вихід глютамінової кислоти значно знижується.

У Японії одержують глютамінову кислоту на м'ясних середовищах за допомогою мутантів, у яких нагромадження амінокислоти контролюється температурним режимом (вихід глютаму 20-26 г/л).

Схема отримання глютамінової кислоти на середовищі з глюкозою, або з гідролізованим крохмалем:

1. Культивування. Здійснюють у ферментері, після чого біомасу виділяють від культуральної рідини центрифугуванням, потім вакуум-випаровування до вмісту сухих речовин 40-50%;
2. Кристалізація глютамінової кислоти. При цьому концентрат підкислюють хлоридною кислотою до рН 3,2; охолоджують до -15°C і відділяють кристали глютамінової кислоти зі ступенем чистоти 80%.
3. Повторна кристалізація (отримані кристали розчиняють у воді 1:5 і фільтрують, отримують глютамінову кислоту зі ступенем чистоти 99%. Готовий продукт висушують.

2. Біотехнологія отримання кормового лізину

Встановлено, що лізин в організмі є не тільки структурним елементом білка, але й виконує ряд найважливіших біохімічних функцій: є попередником каротину та оксилізину, забезпечує транспортування кальцію і стронцію в клітини тощо.

Концентрат лізину можна використовувати в рослинництві як стимулятор росту культурних рослин і атрактант ґрунтових шкідників насіння.

Для біосинтезу лізину використовують гомосериндіфіцитні мутанти ауксотрофних бактерій родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* та ін.

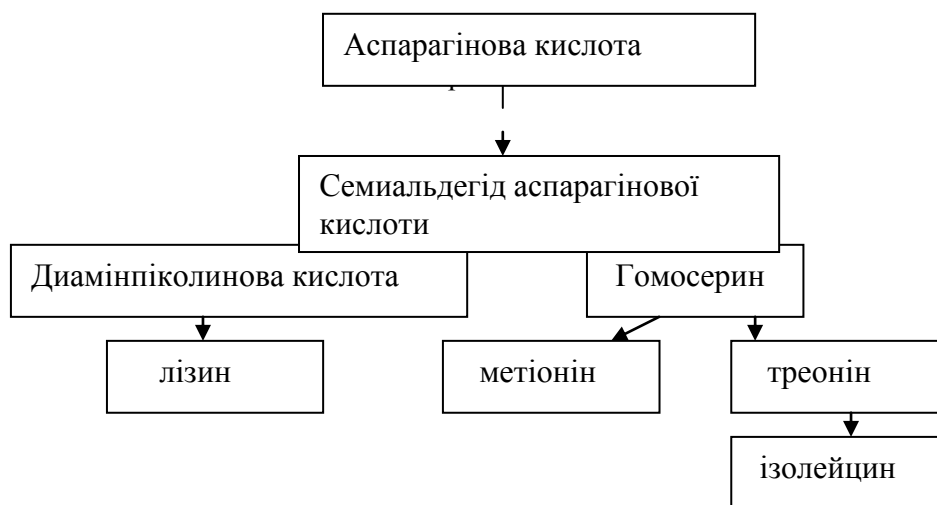


Схема біосинтезу лізину у бактерій через діамінпіколинову кислоту.

У більшості природних штамів зазначених родів бактерій лізин разом з треоніном інгібує фермент аспартаткіназу, що уповільнює утворення лізину. Щоб усунути цей дефект, генетики створили штами, нездатні синтезувати гомосериндегідрогеназу. Таким чином, усувається накопичення гомосерину, треоніну і метіоніну. Якщо до середовища додати в необхідних для росту культури дозах треонін, метіонін або гомосерин, то відбувається інтенсивний синтез лізину.

СТВОРЕНО ШТАМИ р. *Brevibacterium*, що забезпечують на м'ясному середовищі синтез лізину до 50-70 г/л, на сахарозних середовищах - до 100 г/л при продуктивності системи в напівбезперервному процесі 15-20 г/л на добу.

I. Середовище для одержання лізину готується із м'яси, 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.

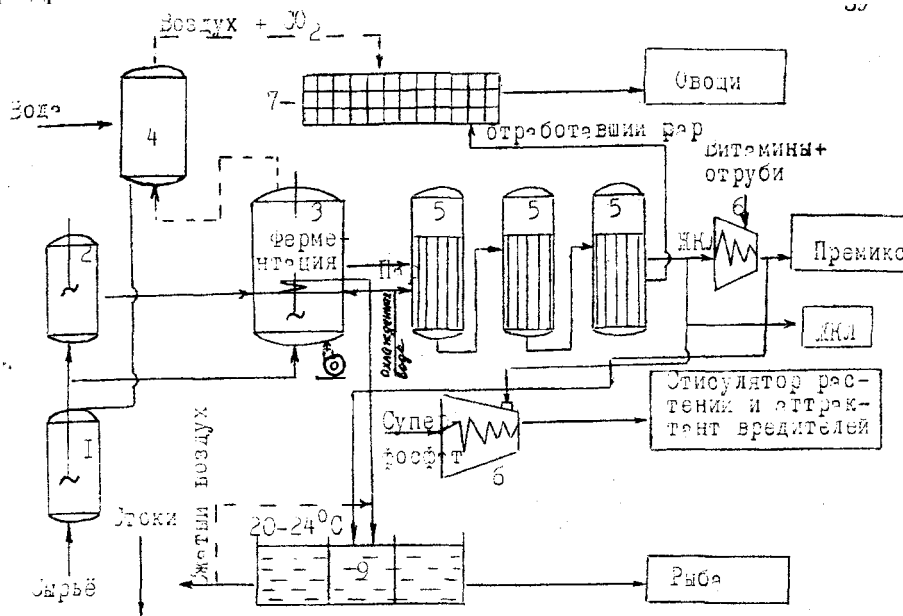
II. Спочатку культуру розмножують у колбах на качалках, потім у ферментерах об'ємом 100 і 3000 л. кількість посівного матеріалу 5-10% оптимальна температура 30-35⁰С і рН 7,4. Тривалість ферментації для кожної стадії близько 24 години. Головна ферментація триває 50-70 годин при аналогічних режимах. Концентрація 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 ввести 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 (рис. 1).

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

- Лізин елюють 2,0-3,5% розчином.
- Елюат упарюють у вакуумі при температурі 60⁰С до 1/20 - 1/70 частини вихідного об'єму,
- потім, за допомогою НСІ встановлюють рН 4,5-5,0;
- охолоджують до 14-18⁰С
- кристалізують.

Після фільтрації і центрифугування кристалів одержують технічний лізин - 94-96% лізину монохлоргидрат.



Мал.1. Схема безвідходної технології одержання концентрату лізину.

1. блок приготування живильного середовища
2. інокулятори
3. ферментатори
4. скрубоер
5. вакуум-випарна установка
6. блок приготування преміксів
7. теплиця
8. блок приготування аттрактантів
9. басейн для вирощування риби
10. рідкий концентрат лізину.

Для одержання чистого лізину кристали технічного лізину піддають нагріванню в невеликій кількості води 70⁰С, додають активоване вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою НСІ встановлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при 60⁰С. Одержаний лізин містить 99,9% лізину монохлоргидрату, і 0,1% золи і не більше 0,001% солей важких металів. Для кормових потреб одержують концентрат лізину.

3.Промислове виробництво органічних кислот

Органічні кислоти використовують у харчовій, хімічній, фармацевтичній, легкій промисловості, у побуті.

Об'єми виробництва органічних кислот, їх продуценти і сировина для їх виробництва в промислових масштабах мікробіологічним шляхом наведені в таблиці 1.

Таблиця 1.

Світове промислове виробництво органічних кислот (Фінагенова, 1984р.)

Кислота	Річний обсяг виробництва	Сировина	Продуценти	Вихід, в %
Лимонна	300000 т	Меляса, н-алкани		85
Ітаконова		Глюкоза, сахароза		60
Молочна	30000 т	Глюкоза		90
Глюконова	30000 т	Глюкоза		95
Оцтова 10%	10 млн. т			90-95
Проіонова		Глюкоза		80

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, α -кетоглутарова допомагає 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. В мелясі є багато заліза, яке на стадії приготування живильного середовища осаджують за допомогою жовтої кров'яної солі.

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

Одержання лимонної кислоти.

Розроблений метод одержання лимонної кислоти із *n*-алканів 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 із меляси.

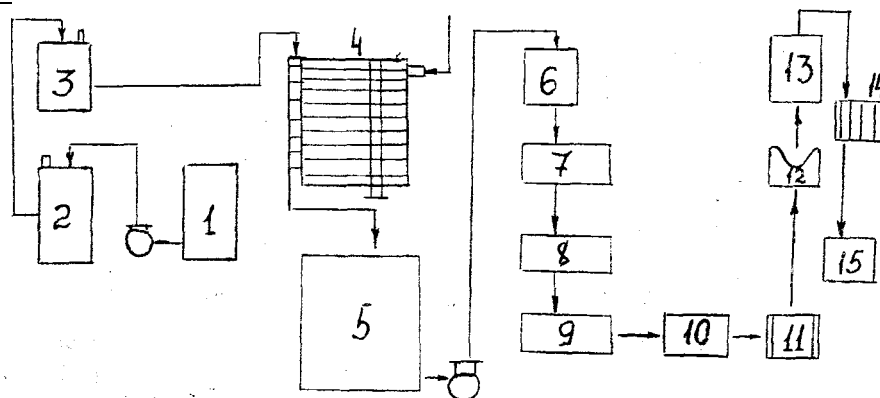


Рис.3. Апаратурно-технологічна схема одержання лимонної кислоти.

1- сховище меляси; 2-смність 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.

Технологія виробництва лимонної кислоти із меляси.

I. В окремому цеху вирощують посівний матеріал у вигляді спор (конідії) *Aspergillus niger*, потім розмножують його в три стадії – у пробірках, колбах і алюмінієвих кюветах. Тривалість кожної стадії 2-4 доби при температурі 32⁰С. Для вирощування у пробірках використовують тверду агаризовану сусло-середовище, для вирощування в колбах і кюветах використовують рідку рідину.

Під час культивування на поверхні розчину утворюється щільна плівка міцелію, яка потім покривається конідіями. На останній стадії вирощування дозрілі і підсушені конідії збирають із кювет за допомогою спеціального вакуумного насоса.

Для збільшення строків зберігання конідії змішують з активованим вугіллям після висушування. Їх можна зберігати в такому вигляді 1-2 роки. З 10 дм² площі кювет можна одержати 3-4 г сухих конідій (площа 1-ї кювети складає 8,5 дм²). Такий посівний матеріал є комерційним препаратом.

II. Лимоннокисле бродіння відбувається в камерах при 34-35⁰ С. На полицях розміщують металеві кислотійкі 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 збродження відводиться маса. У камері передбачена стирильного кондиціонованого 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 100г (м² ч).

Продуктивність бродильних камер можна збільшити, подаючи до міцелію свіже живильне середовище. Це можна здійснити двома методами: 1-цей метод називають обмінним. Він полягає в тому, що після видалення із кювет збродженого розчину і промивання міцелію стирильною водою під плівку заливають свіже стерильне середовище і продовжують зброджування.

2-метод доливок. Цей метод полягає в тому, що через 3-4 доби культивування, коли початкова концентрація цукрів з 7-10% зменшується до 3-4% в результаті зменшується об'єм живильного середовища, під плівку міцелію додають свіже живильне середовище до первісного рівня. Таким чином, у ході одного циклу вдається переробити на 30-40% більше живильного середовища.

III. У кінці бродіння культуральну рідину зливають, міцелій промивають і після висушування використовують на потреби 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 щавлевої кислоти і 7 г незбродженого цукру.

Лимонна кислота складає 90% від загальної маси. Її виділяють із розчину хімічним шляхом.

Виробництво яблучної кислоти

У харчовій промисловості поряд з молочною, лимонною і глюконовою кислотами використовують також яблучну кислоту. 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 каррагінану – полісахариду 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 полуінактивації ферменту 160 діб.

Виробництво оцтової кислоти і оцту

Харчові кислоти: лимонна, молочна, оцтова, винна, іноді яблучна і глутамінова.

Оцет у вигляді перекислового 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. Щоб оцтовокисле бродіння проходило нормально, потрібно щоб цукор був перетворений в етанол, тому оцтовокислому бродінню передують спиртове, але не з тимиштами, що використовуються у виробництві етанолу. У виробництві оцту спиртове бродіння краще за все здійснюють селекційніштами 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. Відомий яблучний, виноградний, грушевий та інші сорти оцту. 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. Із 100 літрів безводного етанолу теоретично повинно бути одержано 103 літри оцтової кислоти. На практиці із 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, антипирин, фенацетин), ароматизованих речовин (кумарин, валілін), а також як субстрат для мікробіологічної біотрансформації.

Ферментацію сахарозних середовищ реалізують за допомогою двох стадій.

1. на першій стадії за допомогою дріжджової інвертази одержують інвертазний цукор;
2. 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.

4. Використання мікроорганізмів для отримання розчинників

Органічні розчинники – ацетон і бутанол широко використовуються не тільки в хімічній, але й в інших областях народного господарства.

Ацетано-бутилове бродіння є анаеробним і викликається бактеріями *A. acetobutylicum*. Ацетон і бутанол одержують зброджуючи зернові, мелясно-зернові суміші або мелясу. Якщо готують із зерна (кукурудзи), борошно грубого помолу спочатку змішують із водою (3 кг муки + 100 л води). Потім суміш варять 2 години під тиском 200 кПа і стерилізують. Охолоджену до 37-42 °С масу зброджують протягом 2-х діб при рН 5-7. У процесі бродіння в перший період утворюються оцтова і масляна кислоти, водень і CO₂. Потім масляна кислота відтворюється до бутилового спирту. Ацетон утворюється із продукту конденсації оцтової кислоти – ацетоацетил СоА при декарбоксілюванні.

У наш час після відділення розчинників, ацетанобутилів барду концентрують десятиразово у вакуум-випарювальних апаратах і висушують у розпилювальних сушарках. Одержують сухий концентрат, що містить 60-100 мгк/л рибофлавіну, і використовують як кормову добавку.

Зараз розроблений метод біосинтезу органічних розчинників на основі синтетичного газу. Реалізований двоступеневий безперервний процес. Спочатку із CO₂ утворюють органічні кислоти за допомогою *Butyribacterium methylotropicum*. Потім кислоти і водень газу перетворюється в бутанол, етанол, ацетон.

На першій стадії процес регулює виміром рН. Він повинен бути в інтервалі 6,5-5,0. При більш низькому рН утворюється більше бутанолу, ніж ацетону.

Одержано мутант, який дає вихід розчинників 22,7 %, концентрація бутанолу в середовищі 13 г/л.