

БИОТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ И ВИТАМИНОВ



Лектор:

К.б.н., Караева Альбина Маирбековна

ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Методы получения аминокислот
2. Механизмы регуляции биосинтеза аминокислот
 - 2.1. Биосинтез лизина
 - 2.2. Биосинтез треонина
3. Особенности культивирования штаммов-продуцентов
 - 3.1. Особенности питательной среды
 - 3.2. Условия ферментации аминокислот
 - 3.3. Применение генной инженерии
4. Контроль качества аминокислот
 - 4.1. Хроматографирование (тонкослойная хроматография ТСХ в анализе аминокислот)

1. Методы получения аминокислот

Аминокислоты являются составными элементами белков. Все 20 аминокислот являются мономерами для построения природных полипептидов и хорошо изучены (методы их синтеза давно подробно описаны). Известно также, что эти соединения существуют в виде оптических изомеров (вспомните теорию строения органических соединений Бутлерова А.М., открывшего асимметрию атома углерода с четырьмя заместителями, определяющими направление и степень вращения плоскости поляризованного света) .

Сегодня известны 4 метода получения аминокислот:

1. химический метод (тонкий органический синтез)
2. химико-энзиматический метод (энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием биологически активных L-изомеров). Метод достаточно дорогой.
3. биологический метод (применение гидролиза белоксодержащих субстратов)
4. прямой микробиологический метод (получение L-аминокислот). Метод более дешевый, экономически выгодный.

Наиболее распространенными методами получения аминокислот являются:

- химико-энзиматический и
- микробиологический.

В качестве примеров использования химико-энзиматического метода можно привести:

- синтез аспарагиновой кислоты из фумаровой (используются клетки *Escherichia coli*)
- синтез L-фенилаланина из коричной кислоты (используются клетки дрожжей).

Современные методы органического синтеза позволяют синтезировать L- и D- формы аминокислот, но только как рацематы (эквимольная смесь двух энантиомеров (оптических изомеров)), дальнейшее разделение которых представляет трудную задачу и экономически не эффективно.

Другой способ получения аминокислот – это микробиологический синтез, когда используют штаммы-продуценты, осуществляющие сверхсинтез аминокислот. Избыточные количества аминокислот, например, L -лизина, L –глутаминовой кислоты, L -треонина, L –трептофана экскретируются (выходят) в культуральную (внешнюю) среду. Культуральная среда в этом случае может содержать от четырех, пяти и до ста граммов целевой аминокислоты на один литр жидкой фазы. В отличие от химического синтеза, в этом случае, то есть при биосинтезе аминокислот с помощью ферментных систем микроорганизмов, получаются исключительно L-формы аминокислот, обуславливающих терапевтический эффект, а не рацематы. Это обстоятельство решает проблему выбора получения аминокислот в промышленном масштабе в пользу биотехнологических методов.

Имея задачу получения аминокислот, используя природные микроорганизмы, надо помнить о механизмах регуляции биосинтеза по принципу обратной связи (ретроингибирование).

Эта регуляция осуществляется либо за счет ингибирования активности одного из начальных ферментов собственного синтеза избыточным продуктом, то есть самой аминокислотой, либо репрессируется весь комплекс ферментов всей биохимической цепочки метаболизма клетки, что является естественной реакцией живого микроорганизма-производителя для сохранения собственного равновесия на клеточном уровне. Таким образом перед биотехнологом стоит задача в нарушении этих механизмов, чтобы иметь возможность получить целевой продукт в необходимых количествах.

Особенности культивирования штаммов-продуцентов аминокислот приводят к следующему результату:

1. достигаются максимально высокие скорости синтеза аминокислот клетками продуцента
2. достигается максимальная длительность работы продуцента
3. минимально образуются побочные продукты биосинтеза аминокислот.

Первая задача решается путем выращивания высокоактивной биомассы и помогают в этом случае наличие в питательной среде:

- источников углерода, аммонийного азота, минеральных солей, ростовых факторов;
- оптимизация рН (кислотность среды), температуры;
- дробная подача субстратов.

Для предотвращения закисления среды проводят автоматическое рН-статирование аммиачной водой и источниками углерода.

В случае биосинтеза лизина добавляют ростовые факторы по мере необходимости, что зависит от самого сырья, от аппаратуры, от температуры.

Процесс биосинтеза энергоемкий и требует интенсивной аэрации и перемешивания.

Для длительной работы ауксотрофных продуцентов лизина в питательную среду вносят комплексный источник аминокислот (белковые гидролизаты).

Ауксотрофы – организмы, которые не способны синтезировать определенное органическое соединение, необходимое для роста этого организма.

Синтез нужной аминокислоты может прекращаться, если на ее продуцент действуют его токсические метаболиты, которые синтезируются самим продуцентом.

Например, в процессе биосинтеза фенилаланина, продуцентом которого является *Bacillus subtilis*, этот продуцент синтезирует примеси ацетона и бутандиола, в результате этого клетки продуцента лизируются, образуют споры и прекращают вырабатывать фенилаланин. Чтобы избежать это явление, необходимо ферментацию вести в условиях лимита (ограничения) по источнику углерода. В этом случае весь сахар расходуется только на синтез фенилаланина, увеличивая как количество (в два раза), так и чистоту получаемого продукта.

Наиболее перспективным направлением являются методы генетической инженерии – введение в клетку продуцента многокопийных плазмид, содержащих гены, контролирующие биосинтез аминокислот в ущерб синтезу биомассы и других клеточных компонентов.

С помощью гибридных плазмид в биосинтезе аминокислот мы получаем

1. рост продуктивности биомассы
2. исчезновение примесей (более чистый продукт)
3. возрастает коэффициент использования субстрата (его минимум дает максимум продукта).

ПРОИЗВОДСТВО ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Первичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов: одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие – участвуют в синтезе коферментов.

Среди наиболее важных для промышленности первичных метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды и витамины.

Производство аминокислот

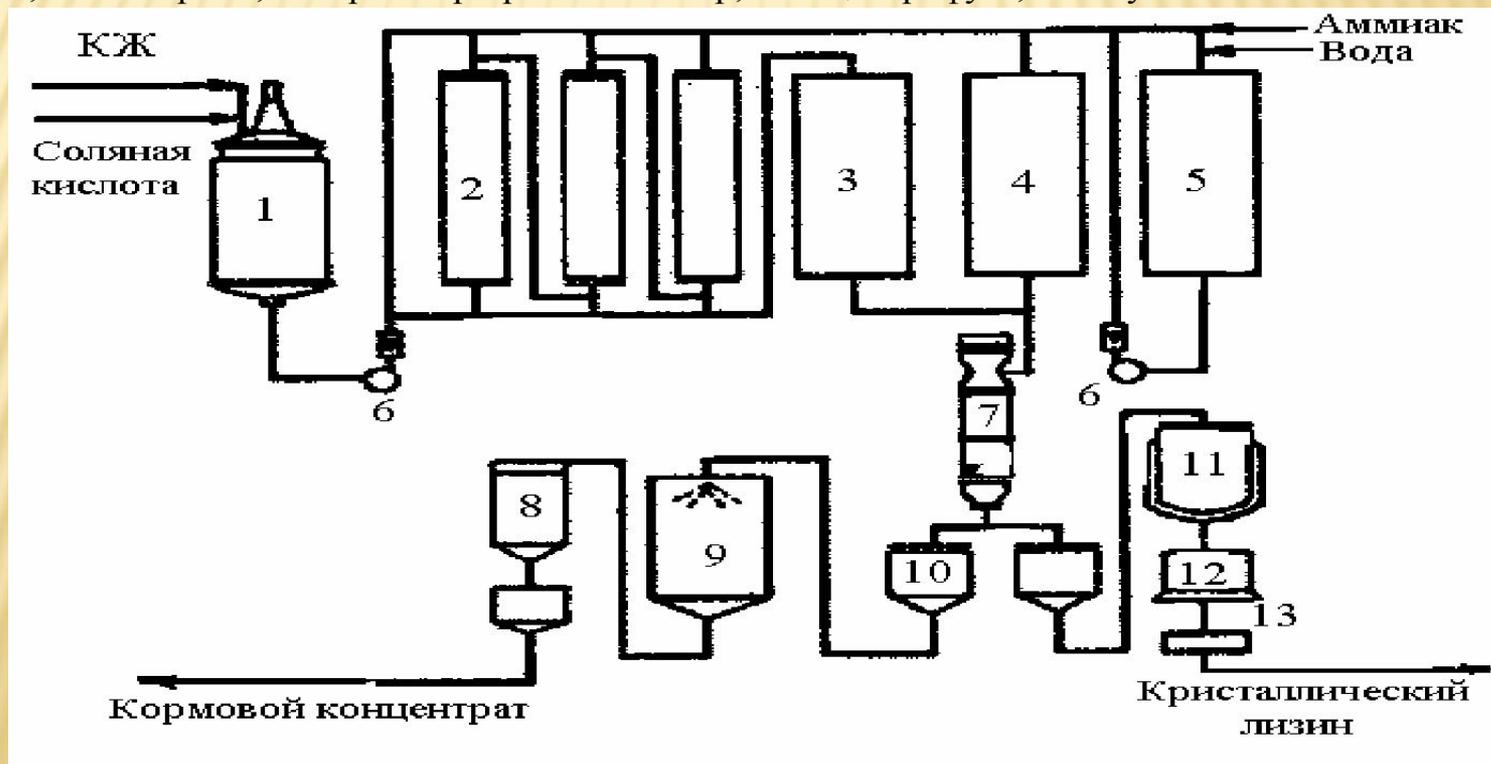
Производство аминокислот в мире постоянно растет и в настоящее время составляет более 400 тыс. тонн/год, хотя потребность в них оценивается гораздо выше. Недостаток в рационе аминокислот (особенно, незаменимых) отрицательно сказывается на росте и развитии.

Микробиологический синтез аминокислот основан на культивировании строго определенного продуцента целевой кислоты в среде заданного состава при строго определенных параметрах ферментации. Продуцентами являются штаммы бактерий, полученные мутантной селекцией или с помощью методов генной инженерии. Бактерии-мутанты, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать некоторые вещества, а с другой стороны, приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты. Уже к 70-м годам прошлого века были получены микробы-суперпродуценты из родов *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* и др. с помощью которых возможно производить все известные аминокислоты. В настоящее время имеются суперпродуценты, у которых количество синтезируемого специфического белка достигает 10–50 % (здесь важнейшую роль играют многокопийные плазмиды, несущие встроенные гены).

Технология получения аминокислот базируется на принципах ферментации продуцентов и выделения первичных метаболитов, т. е. размножают маточную культуру вначале на агаризованной среде в пробирках, затем – на жидкой среде в колбах, инокуляторах и посевных аппаратах, а затем – в основных ферментаторах. Если аминокислота предусмотрена в качестве добавки к кормам, то биотехнологический процесс кормового продукта включает следующие стадии: ферментацию, стабилизацию аминокислоты в культуральной жидкости перед упариванием, вакуум-упаривание, стандартизацию упаренного раствора при добавлении наполнителя, высушивание и упаковку готового продукта, в котором должно содержаться не более 10 % основного вещества. Если же аминокислота используется в качестве лекарственного препарата, в этом случае получают изолированные чистые кристаллы, которые высушивают под вакуумом и упаковывают. Например, в промышленности изготавливают сухой кормовой и жидкий кормовой концентраты лизина наряду с кристаллическим лизином (рис. 1).

Рис. 1. 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



Известны два способа получения аминокислот: одноступенчатый и двухступенчатый. В двухступенчатом способе микроб-продуцент культивируют в среде, где он получает и синтезирует все необходимые ингредиенты для последующего синтеза целевого продукта. Схема двухступенчатого процесса может быть представлена в следующем виде:

Например, мутантный ауксотрофный штамм – продуцент аминокислоты – культивируют на оптимальной для биосинтеза среде. Целевой продукт накапливается в культуральной жидкости, из которой его выделяют согласно схеме на рис. 2.

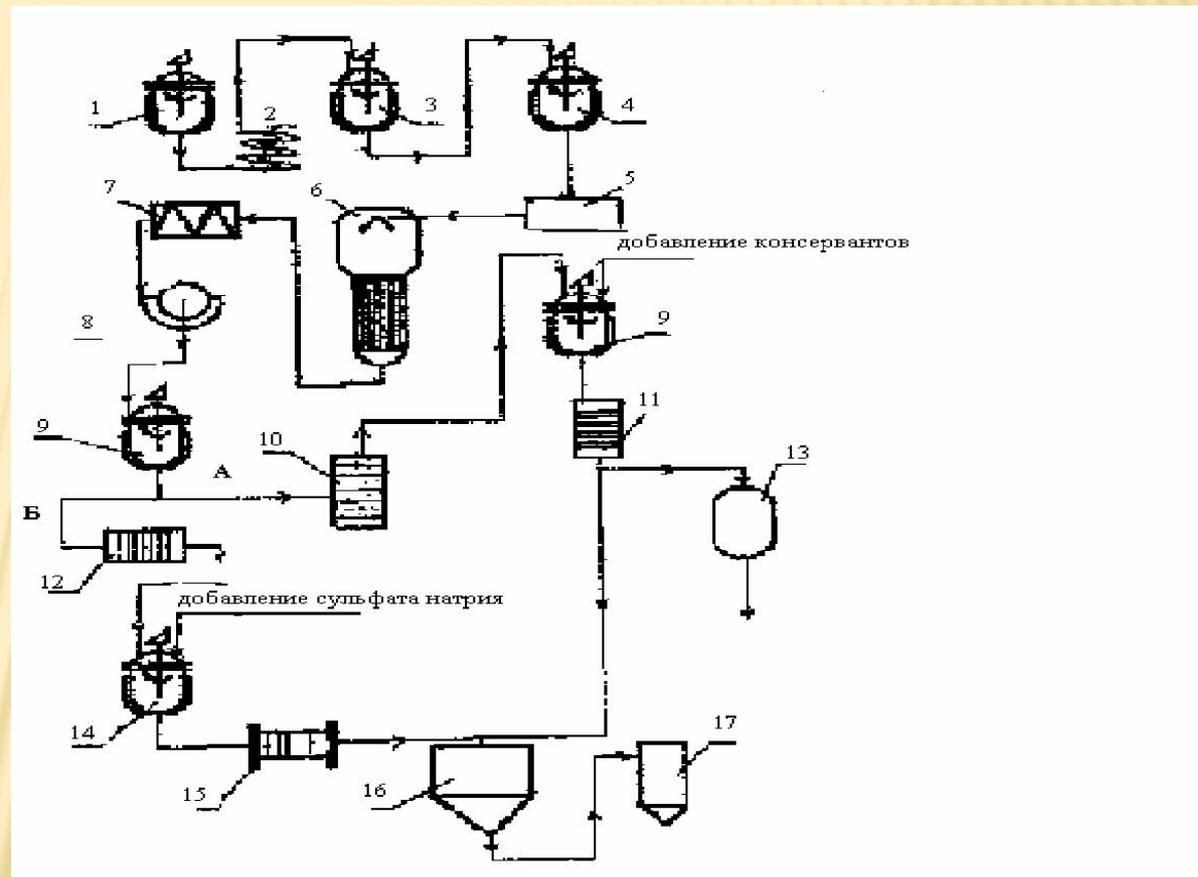


Рис. 2. Примерная технологическая схема получения аминокислоты:

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 глутаминовой кислоты

Глутаминовая кислота – это первая аминокислота, полученная микробиологическим путем. Мутантов, обеспечивающих сверхсинтез этой кислоты, не получено, а «перепроизводство» этой аминокислоты связано с особыми условиями, при которых нарушается синтез мембранных фосфолипидов. Глутаминовая кислота синтезируется исключительно культурами *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*.

Субстратами для ее получения являются глюкоза и уксусная кислота, а в начале 60-х гг. прошлого столетия использовали и *n*-парафины.

Особые условия для роста культур создаются добавлением к культуральной жидкости пенициллина, который подавляет синтез клеточной стенки, или уменьшением (по сравнению с оптимальной) концентрации биотина (витамина В₇) в среде, который индуцирует структурно-функциональные изменения в клеточной мембране, благодаря чему увеличивается ее проницаемость для глутаминовой кислоты, выходящей из клетки в культуральную жидкость. В Японии с помощью селекции выделены температур зависимые штаммы бактерий (термофилы), которые продуцируют высокое содержание глутаминовой кислоты при повышенных температурах: в таких условиях достигают 50 %-го превращения используемого источника углерода в глутаминовую кислоту.

Натриевая соль глутаминовой кислоты широко применяется в пищевой промышленности для улучшения вкуса продуктов питания в консервированном и замороженном виде.

2. Получение витаминов

Витамины представляют группу незаменимых органических соединений различной химической природы. Они необходимы любому организму в небольших концентрациях с целью выполнения в нем каталитических и регуляторных функций. Они не являются материалом для биосинтетических процессов, они не являются источниками энергии.

Что касается источника витаминов – это в первую очередь растения. Витамины поступают в организм человека с пищевыми продуктами. Недостаток витаминов может привести к различным заболеваниям (это цинга, различные анемии и так далее).

Использование витаминов:

1. это лечебные препараты
2. это компоненты сбалансированного питания
3. это компоненты парфюмерной продукции
4. это биологически активные добавки
5. это компоненты для интенсификации биотехнологических процессов производства.

Известно, что высокой биологической активностью обладают, как правило, не сами витамины, а их производные – коферменты. Открыты также коферменты, для которых не обнаружено витаминных аналогов.

Коферментные формы на основе различных витаминов обладают широким спектром действия и эффективно используются в медицинской практике.

Большинство витаминов либо выделяют из природных источников, либо синтезируют химическим путем. Однако, с помощью биотехнологии сегодня производят особо сложные по строению витамины B_2 , B_{12} , β -каротин (провитамин А), РР и предшественники витамина Д (эргостерина).

Кроме того, в синтезе витамина С (аскорбиновой кислоты) используют микроорганизмы как селективные окислители d-сорбита в L-сорбозу.

Получение витамина В₂ (рибофлавин).

Вначале этот витамин выделяли из природного сырья (в максимальных концентрациях он присутствует в моркови и в печени). Затем был разработан как химический, так и микробиологический способы промышленного синтеза. Для рибофлавина характерно функционирование в коэнзимных формах:

- флавиномононуклеотид (ФМН)
- флавинадениндинуклеотид (ФАД).

К источникам рибофлавина относятся:

- высшие растения
- дрожжи
- мицелиальные грибы.

Все они способны синтезировать рибофлавин.

Активным продуцентом рибофлавина являются культура дрожжеподобного гриба *Ermothecium ashbyii* и *Ashbya gossipii*. Сверх синтез рибофлавина можно получить, если действовать на дикие штаммы мутагенами, нарушающими механизм ретроингибирования синтеза витамина В₂, флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды. В состав среды для роста продуцентов рибофлавина входят:

- соевая мука
- кукурузный экстракт
- сахароза
- карбонат кальция
- хлорид натрия
- витамины
- технический жир.

Перед подачей в ферментер среду стерилизуют с помощью антибиотиков и антисептиков во избежание ее инфицирования. По завершении процесса ферментации культуральную жидкость концентрируют, высушивают и смешивают с наполнителями.

В 1983 году в институте генетики был сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, способный синтезировать в три раза больше по сравнению с *Eremothecium ashbyii* и этот продуцент более устойчив к экзогенной кантаминации.

Витамины поставляются в организм с пищей или их назначают в форме лекарственных препаратов при определенных патологических процессах.

Биотехнологическое производство аскорбиновой кислоты (витамина С)

В настоящее время для крупномасштабного производства L-аскорбиновой кислоты (витамина С) используют преимущественно трудоемкий процесс, включающий одну микробиологическую стадию и несколько химических. Исходным субстратом для него является D-глюкоза (рис. 16).

На последнем этапе этого процесса 2-кето-L-гулоновая кислота (2-KLG) превращается в кислых условиях в L-аскорбиновую кислоту.

2

3

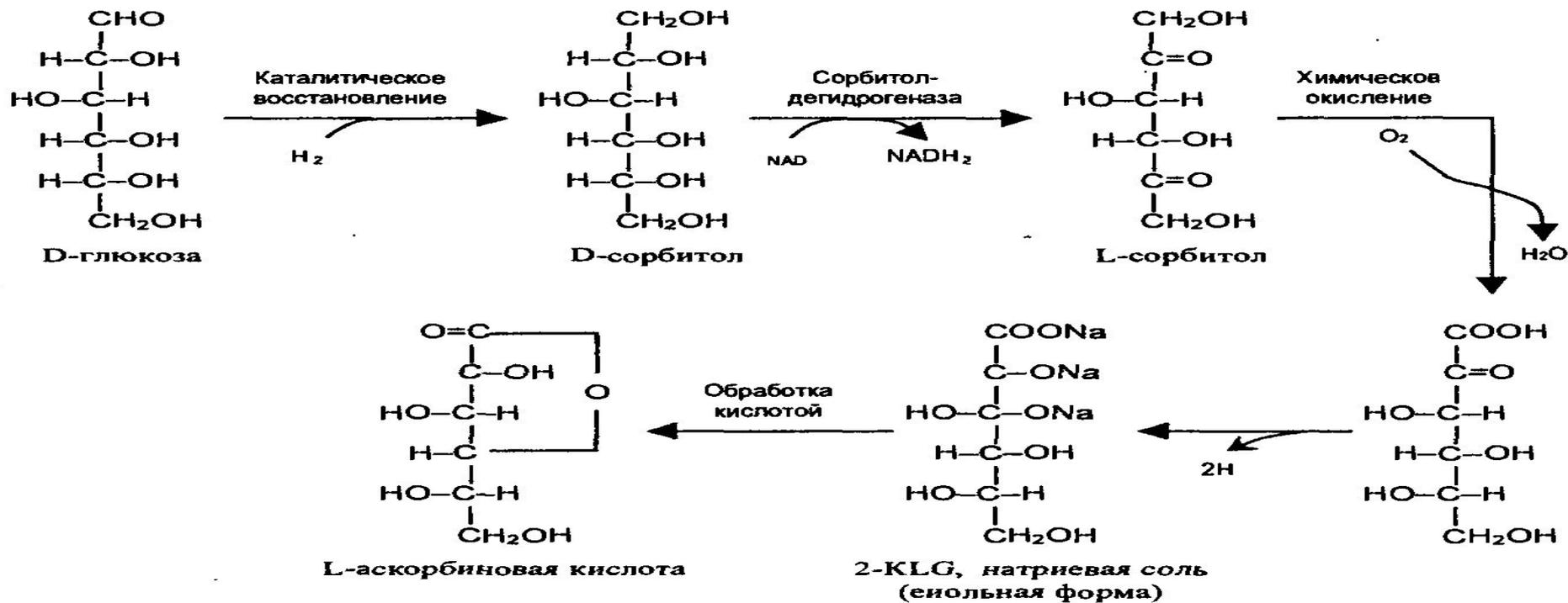


Рис. 16. Промышленный синтез L-аскорбиновой кислоты. Стадия превращения L-сорбитола в L-сорбозу осуществляется при участии бактерии *Acetobacter suboxydans*, которая синтезирует фермент сорбитолдегидрогеназу. Остальные стадии – чисто химические реакции (по Б. Глику, Дж. Пастернаку)

Биохимические исследования метаболизма различных микроорганизмов показали, что 2-KLG можно получить, включая совместное культивирование микроорганизмов *Corynebacterium* и *Erwinia herbicola* для превращения глюкозы в 2-KLG. Однако условия культивирования, оптимальные для одного организма, неприемлемы для другого, что влечет спонтанное «вымывание» из среды одного из них. В подобных случаях можно культивировать микроорганизмы последовательно, но такой процесс трудно сделать непрерывным, так как для роста микроорганизмов необходимы существенно разные среды (рис. 17).

Наиболее простой способ – создание одного микроорганизма, способного превращать D-глюкозу в 2-KLG, состоит в выделении гена

новая кислота), а 2,5-DKG-редуктаза, локализованная в цитоплазме, катализирует процесс превращения 2,5-DKG в 2-KLG.

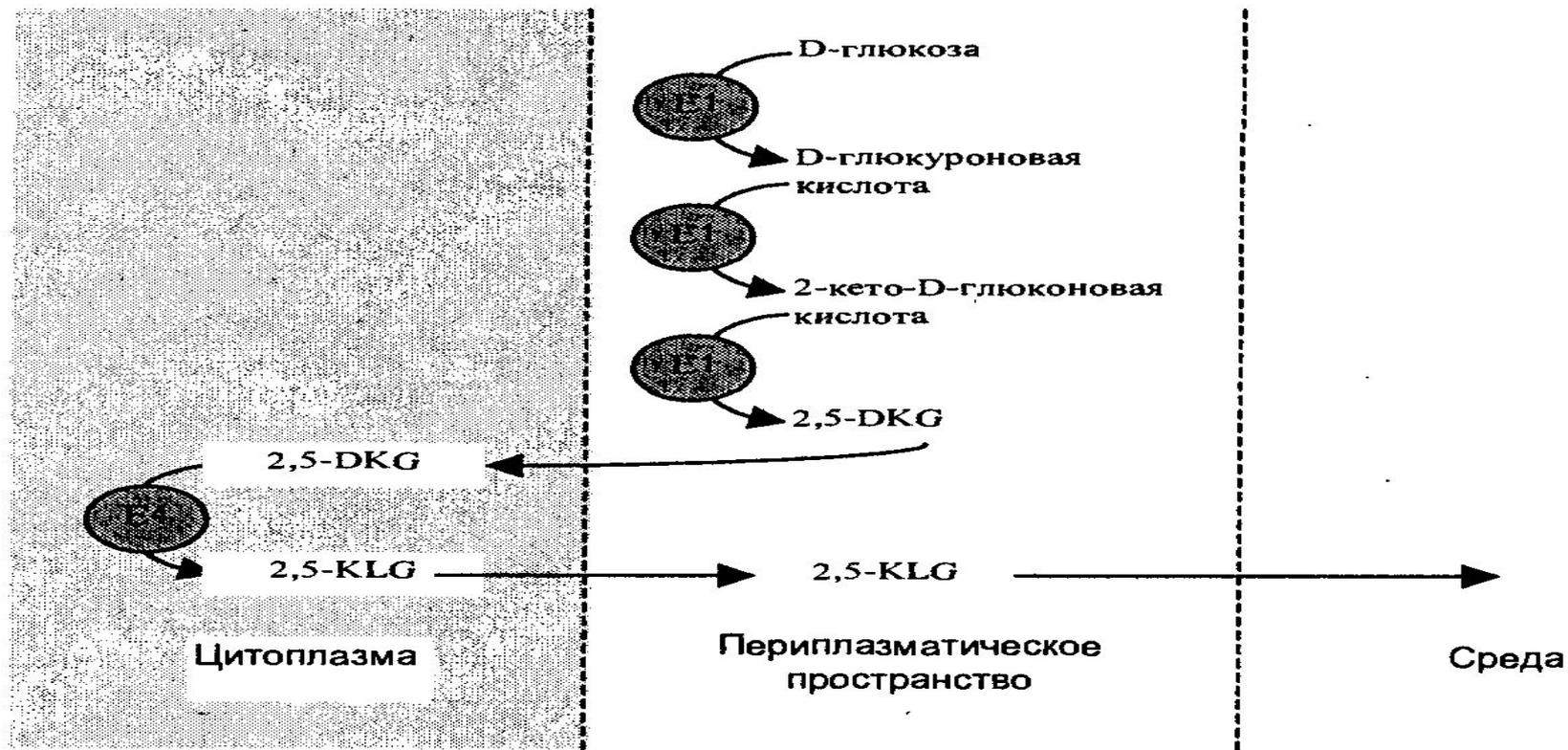


Рис. 18. Превращение D-глюкозы в 2-KLG рекомбинантной бактерией *Erwinia herbicola*. Ферменты, участвующие в этом процессе, обозначены буквой E и последовательно пронумерованы

Следовательно, с помощью генетических манипуляций удалось в одном организме осуществить метаболические реакции, протекающие в столь разных микроорганизмах. Этот гибрид приобрел способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути. Такой организм используется как фабрика для производства 2-KLG, заменяющая три стадии в том процессе получения L-аскорбиновой кислоты, который доминирует и в настоящее время.

Получение витамина В12

Этот витамин был открыт одновременно в США и в Англии. В 1972 г. В Гарвардском университете был осуществлен химический синтез витамина В₁₂, включающий 37 стадий его получения, что лишало возможности организовать промышленное производство этого витамина. С другой стороны это производство было необходимо, так как витамин В₁₂ очень важен в коррекции определенных нарушений в организме человека и животных. Он регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование гемоглобина, применяется для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени и в других случаях.

Сначала витамин В₁₂ получали исключительно из природного сырья (1 тонна печени – 15 миллиграмм витамина).

Единственный способ его получения в настоящее время – это микробиологический синтез в промышленном масштабе. Интересно, что обнаружение витамин В₁₂ как побочного продукта при производстве антибиотиков стимулировало поиск продуцентов этого витамина.

Продуцентами витамина В₁₂ являются пропионовые бактерии, которые и в естественных условиях образуют этот витамин. Учитывая важную функцию витамина в организме человека (он является противоанемическим фактором), его мировое производство достигло 10 т в год, из которых 6,5 т расходуют на медицинские нужды, а 3,5 т – в животноводстве.

Отечественное производство цианкобаламина базируется на использовании культуры *P. freudenreichii var. shermanii*, культивируемой в периодическом режиме без доступа кислорода.

Ферментационная среда обычно содержит глюкозу, кукурузный экстракт, соли аммония и кобальта, рН около 7,0 поддерживают добавлением NH_4OH (гидроксид аммония); продолжительность ферментации – 6 суток; через трое суток в среду добавляют 5,6–диметилбензимидазол – предшественник витамина В12 и продолжают ферментацию еще трое суток.

Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому операции по выделению витамина заключаются в следующем: сепарирование клеток, экстрагирование водой при рН 4,5–5,0 и температуре 85–90 °С в присутствии стабилизатора (0,25 %-й раствор нитрита натрия). Экстракция протекает в течение часа, после чего водный раствор охлаждают, нейтрализуют раствором едкого натра, добавляют коагулянты белка (хлорид железа (III) и сульфат алюминия) с последующим фильтрованием. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, используя методы ионного обмена и хроматографии, после чего проводят кристаллизацию витамина при 3–4°С из водно-ацетонового раствора. Все операции по выделению витамина необходимо проводить в затемненных условиях (или при красном свете) из-за высокой светочувствительности витамина B_{12} .

Витамин В₃ (пантотеновая кислота)

Способ получения – тонкий органический синтез и микробиологический синтез с использованием иммобилизованных клеток бактерий, актиномицетов (основной метод).

Витамин РР

Для получения витамина РР используется биотехнологический метод, метод экстракции из микроорганизмов, обычно из пекарских дрожжей с добавлением предшественников. Используется штамм – *Brevibacterium ammoniagenes*.

Получение витамина D

Витамин D – это группа родственных соединений, в основе которых находится эргостерин, который обнаружен в клеточных мембранах эукариот.

При недостатке в организме гормона 1,25–дигидрокси-холекальциферола, предшественником которого является витамин D, у детей развивается рахит, а у взрослых – остеомаляция.

Трансформация эргостерина в витамин D₂ (кальциферол) происходит под влиянием ультрафиолетового света. При этом разрывается связь в кольце (позиции 9,10) и образуется двойная связь в боковой цепочке (позиции 22, 23). Эта последняя гидрирована в витамине D₃. Физиологическая активность этих витаминов равноценна.

Кроме дрожжей, продуцентами эргостерина могут быть мицелиальные грибы – аспергиллы и пенициллы, в которых содержится 1,2–2,2 % эргостерина, особенно *Saccharomyces cerevisiae*.

Получение эргостерина в производственных условиях можно подразделить на следующие этапы: размножение исходной культуры и накопление инокулята, ферментация, сепарирование клеток, облучение ультрафиолетовыми лучами, высушивание и упаковка целевого продукта.

Так, применительно к дрожжам, инокулят получают на средах, обеспечивающих полноценное развитие клеток, после чего основную среду с ацетатом (активатором биосинтеза стерина), обогащенную источником углерода и содержащую пониженное количество азота, засевают сравнительно большим количеством инокулята. Ферментацию дрожжей проводят при максимальной для конкретного штамма температуре и выраженной аэрации (2 % O_2 в газовой фазе). Спустя трое-четыре суток клетки сепарируют и подвергают вакуум-высушиванию.

Затем сухие дрожжи облучают ультрафиолетовыми лучами (длина волны 280–300 нм). Облученные сухие дрожжи применяют в животноводстве; в промышленности их выпускают под названием «кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D_2 ». В случае получения кристаллического витамина D_2 клетки продуцента гидролизуют соляной кислотой при 110 °С, затем температуру снижают до 75–78 °С и добавляют этанол. Смесь фильтруют при 10–15 °С, оставшуюся после фильтрации массу промывают водой, высушивают, измельчают, нагревают до 78 °С и дважды обрабатывают тройным объемом этанола. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают до 70 %-го содержания сухих веществ. Полученный «липидный концентрат» обрабатывают раствором едкого натра. Эргостерин кристаллизуют из неомыленной фракции концентрата при 0 °С. Его можно очистить повторными кристаллизациями. Кристаллы высушивают, растворяют в этиловом эфире, облучают УФЛ, эфир отгоняют, раствор витамина D_2 концентрируют и кристаллизуют.

β-каротин.

Каротиноиды (политерпены) – это природный пигмент. Общий путь биосинтеза из изопреновых единиц. Источник – это высшие растения, водоросли, микроорганизмы.

Получение - это тонкий органический синтез (химический способ) и биотехнология (использование мицелиальных грибов)

Питательная среда – кукурузно-соевая среда. Процесс получения многостадийный. β-каротин экстрагируется подсолнечным маслом и используется в виде масляных. Если используют химический синтез, то более рентабельно после экстракции его кристаллизовать.

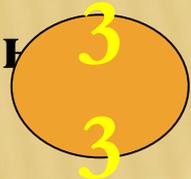
Витамин РР – в его производстве используется биотехнологический метод, применяя способ экстракции из микроорганизмов, обычно это пекарские дрожжи. В качестве штамма используется *Brevibacterium ammoniagenes*.



Убихиноны (коферменты Q) – 2,3 диметокси, 5-метилбензохинон. Эти соединения синтезируются в организме животных и человека. Участие убихинона в метаболических процессах проявляет регуляторный эффект, он же принимает участие в тканевом дыхании, окислительном фосфолирировании, в переносе электронов.

Получение убихинонов – это биотехнология на основе каллусных культур риса или опухолевой ткани. Продуценты – бактерии, дрожжи и дрожжеподобные микроорганизмы. Сухая масса грибов рода *Candida* содержит смесь убихинонов. Это один из примеров, когда биотехнология совмещает в едином процессе получение убихинонов и эргостерина из микробных липидов. Применение убихинонов – при ишемической болезни сердца и при повышенных нагрузках.

Уксуснокислые бактерии, используемые при окислении сорбита в сорбозу (при получении витамина C) содержат убихинон-10 с десятью изопреновыми единицами в боковой цепи, который является коферментом организма человека.



1. Применение генной инженерии при синтезе витамина В₂ и витамина С – открыло новые возможности селекции высокоактивных продуцентов.
2. Внедрение непрерывного способа ферментации в производстве сорбозы увеличило скорости образования этого сахара почти в два раза.
3. Дробная подача компонентов в питательные среды обеспечило высокий уровень ферментации в производстве витамина В₁₂ и сорбозы.
4. Применение иммобилизованных клеток при получении витаминов В₁₂ и В₃ привело к разработке новых конструкций биореакторов.
5. Утилизация различных промышленных отходов существенно снижает себестоимость получаемой продукции – витаминов В₂, В₁₂ и β-каротина, улучшает экологию производства.

Таким образом, получение этих важных биологически активных веществ (БАВ) свидетельствует о существенном вкладе биотехнологии и в этом секторе фармацевтической промышленности.



3. Производство органических кислот

Органические кислоты можно получать как в анаэробных условиях (так называемые бродильные процессы), так и в аэробных условиях (окислительные процессы).

Бродильные процессы

Получение молочной кислоты

Молочная кислота широко применяется в пищевой, текстильной и фармацевтической промышленности, в изготовлении растворителей и пластификаторов в лаках, олифах и т.п.

В промышленном производстве молочной кислоты обычно используют термофильные штаммы бактерий, синтезирующие целевой продукт при 50°C. Таким штаммом является *Lactobacillus delbrueckii*, отличающийся высокими стабильностью и активностью кислотообразования (выход молочной кислоты составляет 95–98 % от потребленной сахарозы).

Принципиальная технологическая схема получения L(+)-молочной кислоты состоит в следующем: меласную среду, содержащую 5–20 % сахара, вытяжку солодовых ростков, дрожжевой экстракт, витамины, фосфат аммония, засевают *L. delbrueckii*. Брожение протекает при 49–50°C при исходном pH 6,3–6,5. По мере образования молочной кислоты ее нейтрализуют мелом. Весь цикл ферментации завершается за 5–10 дней; при этом в культуральной жидкости содержатся 11–14 % лактата кальция и 0,1–0,5 % сахарозы. Клетки бактерий и мел отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают до концентрации 3–0 %, охлаждают до 25°C и подают на кристаллизацию, которая длится 1,5–2 суток. Кристаллы лактата кальция обрабатывают серной кислотой при 60–70°C, гипс выпадает в осадок, а к надосадочной жидкости добавляют желтую кровяную соль при 65°C для удаления ионов железа, затем – сульфат натрия для освобождения от тяжелых металлов. Красящие вещества удаляют с помощью активированного угля. После этого раствор молочной кислоты подвергают вакуум-упариванию до 50 или 80 %. Оставшийся не до конца очищенный раствор молочной кислоты используют для технических целей. Более очищенную кислоту можно получить при перегонке ее сложных метиловых эфиров, при экстракции простым изопропиловым эфиром в противоточных насадочных колоннах.

Получение пропионовой кислоты

Производство пропионовой кислоты осуществляется пропионовыми бактериями, представляющими собой грамположительные, бесспорные, неподвижные палочки семейства *Propionibacteriaceae*, культивируемые в средах, где источником углерода является глюкоза. Из трех молекул глюкозы образуется 4 молекулы пропионовой кислоты, 2 молекулы уксусной кислоты, 2 молекулы углекислого газа и 2 молекулы воды:



Перспективными для производства пропионовой кислоты оказались виды *P. freudenreichii* и *P. acidipropionici*.

Биосинтез кислоты проводят на достаточно простых средах, например такого состава (в %): углевод – 1–2; сульфат аммония – 0,3; гидолфосфат калия – 0,2; хлорид кобальта – 0,0001; биотин – 0,00001; пантотенат – 0,1; тиамин – 0,01.

Конечные продукты ферментации (пропионат и ацетат) можно не разделять, поскольку обе кислоты обладают консервирующими свойствами. Биосинтетическая пропионовая кислота применяется в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве консерванта.

Окислительные процессы

Получение уксусной кислоты

Микробиологическое производство уксусной кислоты экономически выгодно лишь при получении пищевого уксуса, а не технической уксусной кислоты.

Получают уксусную кислоту методом глубинного культивирования грамотрицательных штаммов бактерий *Acetobacter aceti*. Так, при периодическом выращивании *A. aceti* в глубинных условиях при 25–30°C на среде, содержащей 10–11 % этанола, 1 % уксусной кислоты и минеральные соли, выход уксусной кислоты составляет 18–23 кг/м³/сут. Более производительным является непрерывный глубинный процесс, реализуемый в батарее ферментаторов (например, из пяти ферментаторов, емкостью 6 м³ каждый, соединенных последовательно). Исходная среда с 4 % этанола, 1,5 % уксусной кислоты и минеральными солями (моногидрофосфат аммония, дигидрофосфат калия, сульфат магния) непрерывно поступает в первый ферментатор, обогащается спиртом в последующих ферментаторах. Таким образом происходит обогащение среды уксусной кислотой при снижении концентрации этанола. Из последнего ферментатора непрерывно вытекает уксус. Выход уксусной кислоты достигает 30 кг/м³/сут. и более.

Получение лимонной кислоты

Около 60 лет назад лимонную кислоту выделяли преимущественно из плодов цитрусовых растений. Теперь же основную массу ее производят с помощью определенных штаммов плесневого гриба *Aspergillus niger*.

Поскольку основным сырьем для получения лимонной кислоты является меласса, в которой содержится много железа, то на стадии предферментации его осаждают при помощи желтой кровяной соли – $K_4[Fe(CN)_6]$.

Известны два способа ферментации *A. niger* – поверхностный и глубинный. Первый из них реализуют на предприятиях малой и средней мощности в виде жидкофазной ферментации на жидкой среде (например, в ряде стран Европы и Америки) и в виде твердофазной ферментации (например, в Японии).

Технологическая схема жидкофазной ферментации представлена на рис. 3.

Поверхностный способ жидкофазной ферментации для промышленного производства лимонной кислоты реализуют в «бродильных камерах», где на стеллажах (одну над другой) размещают кюветы (8–10 штук на один стеллаж). На дне каждой кюветы расположен сливной штуцер. «Бродильные камеры» оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, обеспечивающей равномерный приток стерильного воздуха заданной температуры и влажности (3–4 м³/м² мицелия час⁻¹). Температура в камерах поддерживается на уровне 34–36 °С, высота питающего слоя жидкой мелассной среды – 6–12 см. Максимальное тепловыделение (500–550 кДж/м² ч) имеет место к пяти суткам; исходная концентрация сахаров в питательной среде в среднем порядка 12 %, начальное значение рН 6,8–7 снижается до 4,5 в течение первых трех суток и до 3,0 к концу процесса (8–9 сутки). Максимальное кислотообразование в таких условиях происходит на 5–6–сутки (100–105 г/м² пленки гриба час⁻¹), а затем стабильно удерживается на уровне 50–60 г/м² час⁻¹.

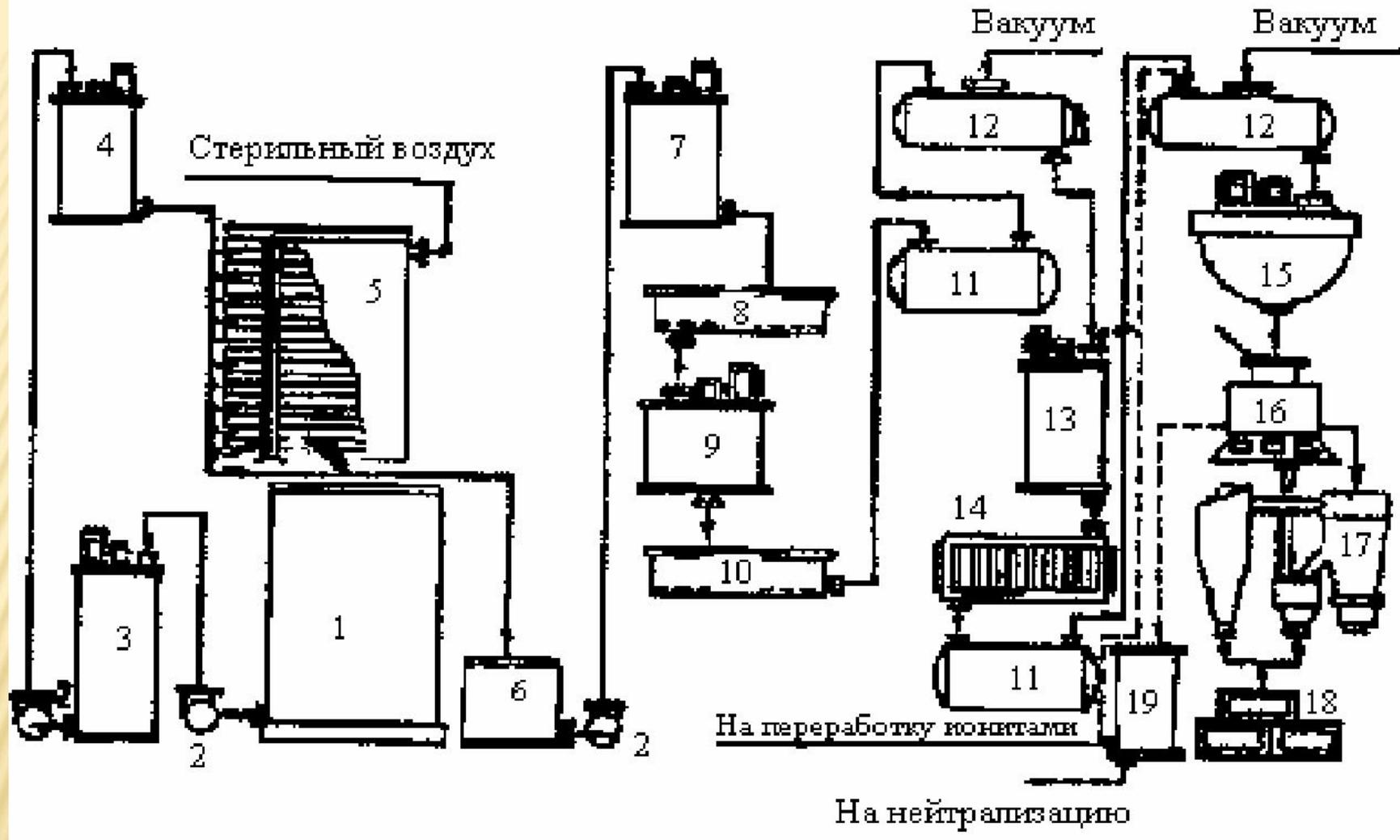
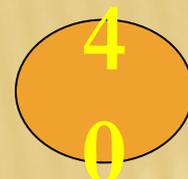


Рис. 3. Технологическая схема получения лимонной кислоты из мелассы поверхностным способом (жидкофазная ферментация):

1 – цистерна для мелассы; 4; 2 – центробежные насосы; 3 – реактор для разбавления мелассы; 4 – стерилизационная камера; 5 – бродильная камера; 6 – сборник сбраживаемых растворов; 7 – нейтрализатор; 8, 10 – нутч-фильтры; 9 – расщепитель; 11 – сборник-монтежу; 12 – вакуум-аппарат; 13 – дисолвер; 14 – фильтр-пресс; 15 – кристаллизатор; 16 – приемник; 17 – сушилка; 18 – готовая продукция; 19 – сборник фильтра

В собранной культуральной жидкости содержится смесь органических кислот – лимонная, глюконовая, щавелевая и неиспользованный сахар в примерном соотношении 45–50:3:1:7, т. е. лимонная кислота составляет от 80 до 90 %. Ее выделяют химическим путем – добавляют к нагретой до 100 °С культуральной жидкости известковое молоко $\text{Ca}(\text{OH})_2$ или мел CaCO_3 , доводя рН до 6,8–7,0; это количество составляет примерно 2,5–3 %; трехзамещенный цитрат кальция, хуже растворимый в горячей воде, чем в холодной, выпадает в осадок вместе с оксалатом кальция (глюконат кальция остается в растворе); осадок отфильтровывают, промывают горячей водой и гидролизуют серной кислотой.

Свободная лимонная кислота остается в растворе, а негидролизированный оксалат кальция и образовавшийся гипс CaSO_4 остаются в осадке. Раствор лимонной кислоты очищают, подвергают вакуум упариванию и кристаллизуют. Кристаллы кислоты высушивают и фасуют. Мицелий продуцента либо используют для выделения фермента пектиназы, либо высушивают и поставляют на корм скоту и домашней птице.



Твердофазная ферментация на уплотненных средах для получения лимонной кислоты – наиболее простой способ из всех известных. Ферментацию определенного штамма *A. niger* проводят на увлажненных отрубях риса или пшеницы, находящихся в кюветах.

Условия биосинтеза кислот при этом аналогичны условиям на агаризированных или в жидких питательных средах. После окончания процесса отруби экстрагируют водой, куда переходят кислоты, а затем выделяют цитрат кальция и чистую лимонную кислоту согласно схеме, изложенной выше.

Глубинный способ производства базируется на использовании специальных культур *A. niger* (В России применяют селекционированный штамм № 288/9). Инокулят подращивают сначала в инокуляторе, затем – в посевном аппарате (примерно в 1/10 объема основного ферментатора) на среде с 3–4 % сахара. Спустя 1–1,5 суток инокулят передают из посевного в основной ферментатор, где процесс ведут в течение 5–7–10 суток на аналогичной среде с трехразовым доливом 25–28 % (по сахару) раствора мелассы с целью доведения конечной концентрации сахара в культуральной жидкости до 12–15 %. После окончания ферментации (контроль – снижение кислотообразования) мицелий гриба отфильтровывают и культуральную жидкость подвергают обработке, как указано выше.

Общая технологическая схема получения лимонной кислоты при глубинной ферментации приведена на рис. 4.



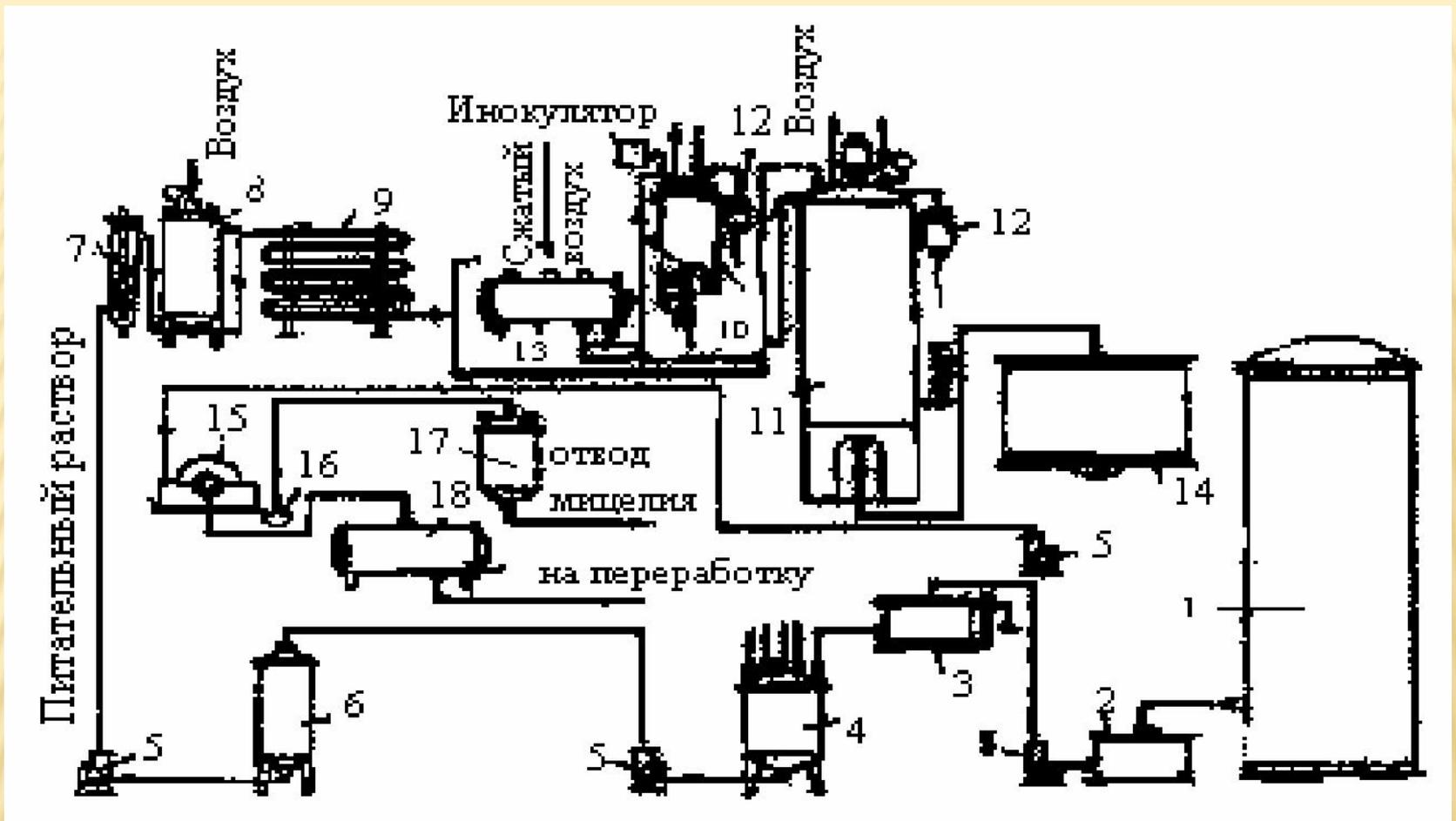


Рис. 4. Технологическая схема получения лимонной кислоты при глубокой ферментации продуцента:
 1 – емкость с мелассой; 2 – приемник мелассы; 3 – весы; 4 – варочный котел; 5 – центробежный насос; 6 – промежуточная емкость; 7 – стерилизующая колонка; 8 – выдерживатель; 9 – холодильник; 10 – посевной аппарат; 11 – головной ферментатор; 12 – стерилизующие фильтры; 13 – емкость для хранения мелассы; 14 – промежуточный сборник; 15 – барабанный вакуум-фильтр; 16 – приемник для мицелия; 17 – вакуум-сборник для мицелия; 18 – вакуум-сборник фильтрата культуральной жидкости

Лимонную кислоту широко используют в пищевой, медицинской, фармацевтической лакокрасочной промышленности.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ !