

УДК 573.6.086.83:577.112.3; 579.66'112.3

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРОИЗВОДСТВА АМИНОКИСЛОТ

Васильковская М.К., 5 курс,
факультет биотехнологии и экологического контроля
Научный руководитель: к.т.н., доцент Пенчук Ю.Н.
Национальный университет пищевых технологий г. Киев

Аминокислоты можно получать химическим синтезом, гидролизом природных белков, микробиологическим синтезом и трансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или ферментов, выделенных из них.

Синтез целого ряда аминокислот химическим путем хорошо изучен и введен в производство. Во многих случаях такое производство экономически выгодно. Но в процессе химического синтеза преимущественно образуется рацемат - смесь *D*-и *L*-форм аминокислот.

D-форма не имеет физиологической ценности для человека и животных: она не включается в обмен веществ и не усваивается. Очистка продукта от *D*-формы приводит к значительным экономическим издержкам и усложнения производства.

Преимущественно химическим путем в промышленности производится глицин, *D,L*-метионин, *L*-фенилаланин, *L*-валин, *L*-треонин, *L*-триптофан [1].

Перспективным методом получения *L*-аминокислот является разделение рацематов аминокислот путем асимметричного гидролиза их производных с использованием микроорганизмов, обладающих специфической *L*-ацилазной, *L*-амидазной, *L*-эстеразной активностью.

Ферментативное разделение рацематов аминокислот с *L*-ацилазами основано на избирательном гидролизе ацилированных производных *L*-аминокислот. При отщеплении ацильной группы *L*-аминокислоты становятся более растворимыми и легко отделяются от малорастворимых ацилированных *D*-аминокислот. Не прореагировавшие производные *D*-аминокислот могут быть подвергнуты рацемизации и вновь использованы для ферментативного разделения [3].

Физиологически активные *L*-формы получают в промышленном масштабе путем кислотного и щелочного гидролиза природных белков.

Наиболее подходящей сырьем для процесса являются отходы различных производств, в том числе непищевых (например, кератинсодержащие отходы). Но этот метод имеет определенные недостатки: высокая стоимость процесса гидролиза, сложность удаления необходимой аминокислоты из смеси аминокислот гидролизата, разрушение части аминокислот в процессе гидролиза и ограниченность сырьевых ресурсов. Преимуществом способа является трансформация отходов непищевых производств в полезный продукт.

Производство аминокислот из белкового гидролизата, как способ получения *L*-аминокислот в настоящее время имеет лишь ограниченное значение, хотя по-

прежнему является основным для производства *L*-серина, *L*-пролина, *L*-оксипролина и *L*-тирозина, он не подходит для крупномасштабного производства аминокислот [1].

Ферментативный синтез аминокислот основывается на процессах с использованием выделенных в индивидуальном виде ферментов, как правило, закрепленных (иммобилизованных) на инертном носителе.

Процесс получения аминокислот заключается в синтезе предшественника аминокислоты и последующей его трансформации в целевую аминокислоту с использованием либо выделенных ферментов, либо микроорганизмов.

Таблица 1 – Способы синтеза *L*-аминокислот с использованием ферментов

Предшественники	Фермент	Продукт
Фумарат аммония	Аспартаза	<i>L</i> -аспарагиновая кислота
Коричная кислота	Фенилаланинаммиаклиаза	<i>L</i> -фенилаланин
Фенилпировиноградная и <i>L</i> -аспарагиновая кислоты	Трансаминаза	<i>L</i> -фенилаланин и пировиноградная кислота
α -Кето и α -оксикислоты	Дегидрогеназа	<i>L</i> -аминокислоты
<i>L</i> -Аспарагиновая кислота	Аспартат- β -декарбоксилаза	<i>L</i> -аланин
Фенол, пировиноградная кислота, аммиак	Тирозинфеноллиаза	<i>L</i> -тирозин
Фенол, серин	Тирозинфеноллиаза	<i>L</i> -тирозин
Индол, пировиноградная кислота, аммиак	Триптофаниндоллиаза	<i>L</i> -триптофан
Индол, серин	Триптофаниндоллиаза	<i>L</i> -триптофан
β -Хлор- <i>L</i> -аланин, сульфид натрия	Цистеиндесульфгидраза	<i>L</i> -цистеин

Для производства *L*-метионина используется метод, в котором применяется ацилаза из *Aspergillus oryzae* в ферментном мембранном реакторе (ФМР). Получение нескольких сотен тонн *L*-метионина и *L*-валина проводится ежегодно с использованием ФМР технологии. Был предложен новый ферментативный путь получения *L*-метионина. Он состоит из ферментативного превращения *D,L*-метионина с помощью фермента, оксидазы *D*-аминокислоты и дегидрогеназы лейцина, оба из которых могут быть проявлены в рекомбинантном штамме *Escherichia coli*.

L-аспарагиновая кислота – другая аминокислота, которая преимущественно производится ферментативно. Аспартаза при добавлении аммиака к фумаровой кислоте катализирует прямое преобразование в *L*-аспартат, который нужен в больших количествах для подсластителя аспартама. *L*-аспартат является также исходным материалом для ферментативного

производства *L*-аланина с использованием иммобилизованной аспарат- β -декарбоксилазы.

Для *L*-цистеина, который ранее производился главным образом путем электрохимического восстановления *L*-цистина полученного гидролизом белков, существует промышленный ферментативный процесс, в котором производная тиазолина *D,L*-2-амино-2-тиазолин-4-карбоновая кислота (АТК) превращается с помощью трех ферментов (*L*-АТК гидролазы, *S*-карбамоил-*L*-цистеин гидролазы и АТК рацемазы) с *Pseudomonas thiazolinophilum*.

Ферментативные методы имеют ряд преимуществ:

- Высокая концентрация веществ в смесях, перерабатываемых, приводит к значительному уменьшению габаритов оборудования, используемого, а также к упрощению процессов выделения и очистки полупродуктов и целевых продуктов синтеза.
- Отсутствие опасности заражения технологической линии посторонними микроорганизмами и, как следствие, возможность проведения процесса в нестерильных условиях (но требования к чистоте исходного сырья и технологических линий при работе с ферментами высокие).

Широкое применение ферментов в крупномасштабном производстве ограничено их труднодоступностью и высокой стоимостью, низкой стабильностью и чувствительностью даже в иммобилизованном виде ко многим внешним факторам [3].

Микробиологический метод получения аминокислот, наиболее распространенный в настоящее время, основан на способности микроорганизмов синтезировать все *L*-аминокислоты, а в определенных условиях – обеспечивать их сверхсинтез. Биосинтез аминокислот в микробных клетках протекает в виде так называемых 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.

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. Чтобы добиться сверхсинтеза отдельных аминокислот, нужно обойти или изменить данный контрольный механизм их синтеза. Для первого пути возможно использование природных «диких» штаммов; очень существенны при этом условия ферментации, так как добиться дисбаланса в системе синтеза аминокислот можно путем изменения ряда основных факторов среды (концентрация основного субстрата, рН, соотношение макро- и микроэлементов в среде и др.). Изменение контрольного механизма синтеза

аминокислот осуществляется генетическими методами. При этом получают мутантные организмы: ауксотрофные и регуляторные мутанты.

В последние годы для получения новых эффективных штаммов продуцентов аминокислот стали применять новейшие методы биотехнологии. Методы генетической инженерии позволяют повышать количество генов биосинтеза путем их клонирования на плазидах. Это приводит к увеличению количества ферментов, ответственных за синтез аминокислот, следовательно, повышает выход целевого продукта. Клонирование генов системы синтеза аминокислот в клетки микроорганизмов с иным, по сравнению с донорским организмом, типом питания позволяет расширять сырьевую базу и заменять дорогостоящие сахаросодержащие субстраты более дешевыми [1].

До сих пор большинство штаммов-продуцентов ВСАА (ВСАА - от англ. Branched-chain amino acids: *L*-валин, *L*-лейцин и *L*-изолейцин) были разработаны путем случайного мутагенеза. Этот классический подход был успешным, как и для других продуцентов аминокислот, но он имеет некоторые недостатки. Генетические изменения, вызванные мутагенезом, могут касаться тех частей генетического аппарата клетки, которые непосредственно не связаны с биосинтезом аминокислоты, в результате чего могут произойти нежелательные изменения в клеточной физиологии. Очень трудно осуществить дальнейшее улучшение штаммов со случайными мутациями. Лучшее решение этой проблемы является конструирование штаммов-продуцентов аминокислот с использованием методов рациональной метаболической инженерии. Чаще всего это осуществляется путем блокирования конкурирующего пути и с помощью гиперэкспрессии генов биосинтеза [2].

Аминокислоты *L*-фенилаланин и *L*-цистеин, которые ранее изготавливались в основном с помощью ферментов, теперь могут быть получены более экономически эффективным путем ферментации с использованием штаммов *E. coli* и, таким образом, стать более доступными для растущего рынка. Почти все протеиногенные аминокислоты, за немногими исключениями, могут быть изготовлены промышленным способом специально разработанными мутантными штаммами *Corynebacterium glutamicum* и *E. coli* [3].

Библиографический список

1. Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. – Vol. 69. – P. 1–8
2. Park J.H., Lee S.Y. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering // Appl Microbiol and Biotechnol. – 2010. – Vol. 85. – P. 491–506
3. Takors R., Bathe B., Rieping M., Hans S. Systems biology for industrial strains and fermentation processes—Example: Amino acids // J. Biotechnology. – 2007. – Vol. 129. – P. 181–190

CURRENT STATUS OF PRODUCTION OF AMINO ACIDS AS PHARMACEUTICAL SUBSTANCES

Vasylykivska M.K., Penchuk U.N.

Amino acids can be obtained by chemical synthesis, by hydrolysis from natural proteins, by microbiological synthesis and by transformation of the precursors of amino acids using microorganisms or enzymes isolated from them. This article considers the modern methods of production of amino acids and the benefits of biotechnological methods of their obtaining.

УДК 60.01

ПОВЫШЕНИЕ КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ СОВРЕМЕННОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ПУТЕМ РАЗРАБОТКИ И РЕАЛИЗАЦИИ АЛГОРИТМА ДЛЯ ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНОГО ФЕРМЕНТАЦИОННОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Герасименко В.А., 5 курс (м),

факультет биотехнологии и экологического контроля

Научный руководитель: к.т.н. доц. Карлаш Ю.В.

Национальный университет пищевых технологий г. Киев

Текущее состояние биотехнологии в Украине и Российской Федерации характеризуется, с одной стороны, отставанием объемов производства от уровня и темпов роста стран, являющихся технологическими лидерами в этой области, а с другой – возрастающим спросом на биотехнологическую продукцию со стороны потребителей. Результатом стала высокая импортозависимость по важнейшим традиционным биотехнологическим продуктам – лекарственным препаратам и кормовым добавкам, и отсутствие на рынке собственных инновационных биотехнологических продуктов. К тому же, в нынешних условиях рыночной экономики и упадка биотехнологической отрасли остро стоит вопрос восстановления ее конкурентоспособности.

Конкурентоспособная себестоимость продукции биотехнологического производства закладывается на этапе проектирование производства. Одной из важнейших стадий в проектируемой биотехнологии является стадия биосинтеза. Учитывая это можно сказать, что ферментационные системы и оборудование представляют собой одну из основных составляющих биотехнологического процесса, как по сложности реализации, так и по влиянию на рентабельность производства. Рассматривая ферментационное оборудование и процессы в таком контексте, при проектировании нового биотехнологического производства важным становится решение проблем, связанных с оптимальным подбором конструктивных характеристик и технологических параметров работы ферментаторов.

Несмотря на то, что уже давно известны различные математические модели процесса периодического аэробного культивирования, существующие методы расчета и прогнозирования изменений технологических параметров ферментации до сих пор остаются несовершенными. К тому же эмпирические