

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ВИРОБНИЦТВА АМІНОКИСЛОТ

Васильківська М.К., Пенчук Ю.М.

Національний університет харчових технологій

Анотація. Розглянуто сучасні біотехнологічні методи виробництва амінокислот, такі як розділення рацематів, метаболітична і генетична інженерія та ферментативний синтез.

В роботі розглянуто основні продуценти амінокислот, а також шляхи підвищення їх біосинтетичної здатності.

Ключові слова: амінокислоти, мікроорганізми, біосинтез, розділення рацематів.

Вступ. Амінокислоти можна отримувати хімічним синтезом, гідролізом природних білків, мікробіологічними синтезом і трансформацією попередників амінокислот за допомогою мікроорганізмів або ферментів, виділених з них. Синтез цілого ряду амінокислот хімічним шляхом добре вивчений і впроваджений у виробництво. У багатьох випадках таке виробництво є економічно вигідним. Але в процесі хімічного синтезу переважно утворюється рацемат – суміш *D*- і *L*-форм амінокислот. *D*-форма не має фізіологічної цінності для людини і тварин: вона не включається в обмін речовин і не засвоюється. Очищення продукту від *D*-форми призводить до значних економічних витрат і ускладнення виробництва

Переважно хімічним шляхом в промисловості виробляється гліцин, *DL*-метіонін, *L*-фенілаланін, *L*-валін, *L*-треонін, *L*-триптофан [1]. Перспективним методом отримання *L*-амінокислот є розділення рацематів амінокислот шляхом асиметричного гідролізу їх похідних з використанням мікроорганізмів, які мають специфічну *L*-ацилазну, *L*-амідазну, *L*-естеразну активність.

Ферментативне розділення рацематів амінокислот з *L*-ацилазами засноване на виборчому гідролізі ацильованих похідних *L*-амінокислот. При відщепленні ацильних груп *L*-амінокислоти стають більш розчинними і легко відокремлюються від малорозчинних ацильованих *D*-амінокислот. Непрореаговані похідні *D*-амінокислот можуть бути піддані рацемізації і знову використані для ферментативного розділення [3].

Методи досліджень. Фізіологічно активні *L*-форми отримують в промисловому масштабі шляхом кислотного та лужного гідролізу природних білків. Найбільш придатною сировиною для процесу є відходи різних виробництв, у тому числі нехарчових (наприклад, кератинвмісні відходи). Але цей метод має певні недоліки: висока вартість процесу гідролізу, складність видалення необхідної амінокислоти з суміші амінокислот гідролізату, руйнування частини амінокислот в процесі гідролізу і обмеженість сировинних ресурсів. Перевагою способу є трансформація відходів нехарчових виробництв в корисний продукт.

Виробництво амінокислот з білкового гідролізату, як спосіб отримання *L*-амінокислот в даний час має лише обмежене значення, хоча як і раніше є основним для виробництва *L*-серину, *L*-проліну, *L*-оксипроліну і *L*-тирозину, він не підходить для великомасштабного виробництва амінокислот [1].

Ферментативний синтез амінокислот ґрунтується на процесах з використанням виділених в індивідуальному вигляді ферментів, як правило, закріплених (іммобілізованих) на інертному носії. Процес отримання амінокислот полягає в синтезі попередника амінокислоти та його подальшої трансформації в цільову амінокислоту з використанням або виділених ферментів, або мікроорганізмів. Способи синтезу *L*-амінокислот з використанням ферментів наведено у таблиці.

Таблиця 1

Способи синтезу *L*-амінокислот

Попередники	Фермент	Продукт
Фумарат амонію	Аспартаза	<i>L</i> -аспарагінова кислота
Корична кислота	Фенілаланінаміакліаза	<i>L</i> -фенілаланін
Фенілпіровиноградна та <i>L</i> -аспарагінова кислоти	Трансаміназа	<i>L</i> -фенілаланін та піровиноградна кислота
α -Кето и α -оксикислоти	Дегідрогеназа	<i>L</i> -амінокислоти
<i>L</i> -Аспарагінова кислота	Аспартат- β -декарбоксилаза	<i>L</i> -аланін
Фенол, піровиноградна кислота, аміак, серин	Тирозинфенолліаза	<i>L</i> -тирозин
Індол, піровиноградна кислота, аміак, серин	Триптофаніндолліаза	<i>L</i> -триптофан
β -Хлор- <i>L</i> -аланін, сульфід натрію	Цистеїндесульфгідраза	<i>L</i> -цистеїн
Гліин, метанол	Сериндегідраза	<i>L</i> -серин
Гліин, тетрагірофолат	Серинтрансметилаза	<i>L</i> -серин

Для виробництва *L*-метіоніну використовується метод, в якому застосовується ацилаза з *Aspergillus oryzae* в ферментному мембранному реакторі (ФМР). Отримання кількох сотень тонн *L*-метіоніну і *L*-валіну проводиться щорічно з використанням ФМР технології. Був запропонований новий ферментативний шлях отримання *L*-метіоніну. Він складається з ферментативного перетворення *DL*-метіоніну за допомогою ферментів оксидази *D*-амінокислоти і дегідрогенази лейцину, обидва з яких можуть бути експресовані в рекомбінантному штамі *Escherichia coli*.

L-аспарагінова кислота – інша амінокислота, яка переважно виробляється ферментативно. Аспартаза при додаванні аміаку до фумарової кислоти каталізує пряме перетворення в *L*-аспартат, який потрібен у великих кількостях для

підсолоджувача аспартама. *L*-аспартат є також вихідним матеріалом для ферментативного виробництва *L*-аланіну з використанням іммобілізованої аспартат- β -декарбоксилази.

Для *L*-цистеїну, який раніше вироблявся головним чином шляхом електрохімічного відновлення *L*-цистину отриманого гідролізом білків, існує промисловий ферментативний процес, в якому похідна тiazоліну *DL*-2-аміно-2-тіазолін-4-карбонова кислота (АТК) перетворюється за допомогою трьох ферментів (*L*-АТС гідролази, *S*-карбамоіл-*L*-цистеїн гідролази і АТК рацемази) з *Pseudomonas thiazolinophilum*.

Ферментативні методи мають ряд переваг:

- Висока концентрація речовин у сумішах, що переробляються, призводить до значного зменшення габаритів обладнання, що використовується, а також до спрощення процесів виділення і очищення напівпродуктів та цільових продуктів синтезу.
- Відсутність небезпеки зараження технологічної лінії сторонніми мікроорганізмами і, як наслідок, можливість проведення процесу в нестерильних умовах (але вимоги до чистоти вихідної сировини і технологічних ліній при роботі з ферментами високі).

Широке застосування ферментів у великомасштабному виробництві обмежено їх важкодоступністю і високою вартістю, низькою стабільністю і чутливістю навіть в іммобілізованому вигляді до багатьох зовнішніх чинників [3].

Мікробіологічний метод отримання амінокислот, найбільш поширений в даний час, заснований на здатності мікроорганізмів синтезувати *L*-амінокислоти, а в певних умовах – забезпечувати їх надсинтез. Біосинтез амінокислот в мікробних клітинах протікає у вигляді так званих вільних амінокислот або «пулу амінокислот», з якого в процесах конструктивного метаболізму синтезуються клітинні макромолекули. Шляхи синтезу більшості амінокислот взаємопов'язані. При цьому одні амінокислоти є попередниками для біосинтезу інших.

Результати та обговорення. Синтез кожної амінокислоти в мікробних клітинах реалізується в строго певних кількостях, що забезпечують утворення наступних амінокислот, і знаходиться під суворим генетичним контролем. Контроль здійснюється за принципом зворотного зв'язку на рівні генів, відповідальних за синтез відповідних ферментів (репресія), і на рівні самих ферментів, які в результаті надлишку амінокислот, що утворюються, можуть змінювати свою активність (ретроінгібування). Даний механізм контролю виключає надвиробництво амінокислот і також перешкоджає їх виділенню з клітин в навколишнє середовище. Щоб домогтися надсинтезу окремих амінокислот, потрібно обійти або змінити даний контрольний механізм їх синтезу. Для першого шляху можливе використання природних «диких» штамів; дуже істотні при цьому умови ферментації, так як домогтися дисбалансу в системі синтезу амінокислот можна шляхом зміни ряду основних факторів середовища (концентрація основного субстрату, рН, співвідношення макро- і мікроелементів в середовищі і ін.). Зміна контрольного механізму

синтезу амінокислот здійснюється генетичними методами. При цьому отримують мутантні організми: ауксотрофні та регуляторні мутанти.

В останні роки для отримання нових ефективних штамів продуцентів амінокислот стали застосовувати новітні методи біотехнології. Методи генетичної інженерії дозволяють підвищувати кількість генів біосинтезу шляхом їх клонування на плазмиди. Це призводить до збільшення кількості ферментів, відповідальних за синтез амінокислот, отже, підвищує вихід цільового продукту. Клонування генів системи синтезу амінокислот в клітині мікроорганізмів з іншим, у порівнянні з донорським організмом, типом харчування дозволяє розширювати сировинну базу і замінювати дорогі цукровмісні субстрати дешевшими [1].

До цих пір більшість штамів-продуцентів ВСАА (ВСАА – від англ. Branched-chain amino acids: *L*-валін, *L*-лейцин і *L*-ізолейцин) були розроблені шляхом випадкового мутагенезу. Цей класичний підхід був успішним, як і для інших продуцентів амінокислот, але він має деякі недоліки. Генетичні зміни, викликані мутагенезом, можуть стосуватися тих частин генетичного апарату клітини, які безпосередньо не пов'язані з біосинтезом амінокислоти, в результаті чого можуть відбутися небажані зміни в клітинній фізіології. Дуже важко здійснити подальше поліпшення штамів з випадковими мутаціями. Найкраще вирішення цієї проблеми є конструювання штамів-продуцентів амінокислот з використанням методів раціональної метаболічної інженерії. Найчастіше це здійснюється шляхом блокування конкуруючого шляху і за допомогою гіперекспресії генів біосинтезу [2].

Висновки. Амінокислоти *L*-фенілаланін і *L*-цистеїн, які раніше виготовлялися в основному за допомогою ферментів, тепер можуть бути отримати більш економічно ефективним шляхом ферментації з використанням штамів *E. coli* і, таким чином, стати більш доступними для зростаючого ринку. Майже всі протеїногенні амінокислоти, за небагатьма винятками, можуть бути виготовлені промисловим способом спеціально розробленими мутантними штамми *Corynebacterium glutamicum* і *E. coli* [3].

Література:

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

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРОИЗВОДСТВА АМИНОКИСЛОТ

Васильковская М.К., Пенчук Ю.Н.

Национальный университет пищевых технологий

Рассмотрены современные биотехнологические методы производства аминокислот, такие как разделение рацематов, ферментативный синтез, метаболическая и генетическая инженерия.

В работе рассмотрены основные продуценты аминокислот, а также пути повышения их биосинтетических способности.

Ключевые слова: *аминокислоты, микроорганизмы, биосинтез, разделение рацематов.*

CURRENT STATUS AND FUTURE PRODUCTION BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF AMINO ACIDS

Maryna Vasylykivska, Penchuk Yuri

National university of food technologies

The modern biotechnological methods for production of amino acids, such as the separation of racemates, enzymatic synthesis, metabolic and genetic engineering.

This paper describes the main producers of amino acids, as well as ways to increase their biosynthetic abilities.

In recent years, for new and effective strains producing amino acids began to apply the newest techniques of biotechnology. Methods of genetic engineering allow to increase the number of genes of the biosynthesis by cloning them in plasmid. This leads to an increase in the number of enzymes responsible for synthesis of amino acids, therefore, increases the yield of the desired product.

Keywords: *amino acids, microorganisms, biosynthesis, separation of racemates.*