МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ОБРАЗОВАНИЯ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

“ХАРЬКОВСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ”

Кафедра биотехнологии и аналитической химии

Реферат на тему: “ПРОИЗВОДСТВО L-ЛИЗИНА”

с курса “Фармацевтическая биотехнология”

Выполнила:

студентка групи О- 55 а

Скуратовская Л. М.

Проверил:

Краснопольский Ю.М.

Харків 2010

**ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИЗИНА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ**

В отличие от производства кормовых дрожжей промышленное получение лизина и других аминокислот осуществляется в строго асептических условиях, на стерильных питательных средах с исполь­зованием чистой культуры продуцента. Принципиальная технологи­ческая последовательность процесса получения лизина следующая: приготовление посевного материала; подготовка и стерилизация пита­тельной среды, всей аппаратуры и коммуникаций; культивирование продуцента в промышленных ферментаторах (ферментация); выделе­ние целевого продукта (L-лизина).

**Приготовление посевного материала**

Посевная культура продуцента может быть приготовлена двумя способами; периодическим и непрерывным. В настоящее время на биохимических заводах, выпускающих лизин, приготовление по­севной культуры ведется преимущественно периодическим ме­тодом.

Свободную от фага и посторонней микрофлоры исходную культу­ру продуцента с чашек Петри с агаром Хоттингера пересевают в про­бирки с 2%-ным мясопептонным агаром и выращивают в течение суток при температуре 29-30 °С. На основе этой культуры готовят на сте­рильной водопроводной воде суспензию плотностью 108 клеток на 1 мл (ориентировочно 8-10 мл воды на одну пробирку). Полученной суспензией засевают стерильную питательную среду в качалочных колбах.

Для получения посевного материала используют среды различного состава. Чаще всего в среду входят меласса (3-5 %), кукурузный экстракт (2,5-3,0 %) и поваренная соль (до 0,4 %). Среду подтитровывают 20 %-ным раствором едкого натра до величины рН 7-7,2. В качалочные колбы объемом 750 мл заливают по 100-120 мл среды и стери­лизуют в автоклаве. После охлаждения среду в каждой колбе засева­ют 2 мл посевной суспензии и выращивают куль-туру в течение суток на качалках (180-200 об/мин) при температуре 29-30 °С - это так назы­ваемые маточные посевные колбы. Затем засевают посевные колбы со средой того же состава из расчета 5 % маточной суточной культуры. Посевные колбы выдерживают на качалках в течение суток при темпе­ратуре 30 °С. Культурой из посевных колб засевают первый инокуля-тор из расчета 0,05- 0,1 % по объему и выращивают ее в течение суток отъемно-доливным способом при аэрации и перемешивании. Темпера­тура выращивания 29-30 °С.

В инокуляторе состав среды может быть таким же или другим, более близким к производственной питательной среде. Для каждого продуцента состав среды устанавливают экспериментально.

Посевную срелу стерилизуют, как правило, в посевном аппарате. Если производственные ферментаторы имеют очень большую емкость или производительность завода велика, предусматривают еще одну ступень инокуляторов, объемы которых больше предыдущих, так как количество задаваемой в аппарат посевной культуры сравнительно высоко (1-5, а для ряда продуцентов 20-30 % по объему). Следует помнить, что при периодическом способе получения посевной культу­ры независимо от количества стадий длительность выращивания про­дуцента на каждой стадии составляет 16-24 ч.

В настоящее время предложен и разработан для производства L-лизина непрерывный способ получения посевного материала. Обновление исходной культуры и первые этапы размножения культуры осуществ­ляют в лабораторных условиях, но вместо качалочных колб выращи­вания культуры проводят на специальном лабораторном стенде в небольших аппаратах с автоматическим регулированием заданных параметров, что позволяет значительно увеличить количество полу­чаемой культуры и сократить время выращивания производственной культуры за счет увеличения дозы посевного материала.

В инокулятор загружают стерильную среду на 1/3 объема, задают с лабораторного стенда 5-6 % посевной культуры, подключают инокуляторы к сборнику со стерильной питательной средой и при ин­тенсивной аэрации и перемешивании среды осуществляют выращива­ние до тех пор, пока среда с культурой не займет 1/2 полного объема инокулятора. Затем начинают подачу культуральной жидкости из ниокулятора в посевной ферментатор, в который поступает и свежая питательная среда. Скорость подачи среды и культуры зависит от физиологических особенностей продуцента. Когда посевной фермента­тор будет заполнен на 0,6 (полное заполнение), подачу культуры из инокулятора переключают на следующий посевной ферментатор и т. д. Из посевного ферментатора готовый посевной материал направляют в производство или в предварительно простерилиэованные сборники объемом 25-35 м3.

Такая схема позволяет использовать в производстве до 30 % посев­ного материала. По этой схеме из инокулятора поток культуры направ­ляют в посевной аппарат только во время загрузки. Инокулятор или посевной аппарат поочередно выполняют функции промежуточной емкости для обеспечения непрерывности при поочередной подготовке и стерилизации аппаратуры. Когда схема работает на установившемся режиме, три посевных ферментатора находятся в стадии выращивания культуры, а четвертый - в состоянии подготовки. Межстерилиэационный период для аппаратуры, предназначенной для производства посевной культуры - продуцента аминокислот, составляет 72 ч. Таких линий на производстве может быть несколько в зависимости от произ­водительности предприятия и количества задаваемого посевного материала. При использовании посевного материала, полученного методом непрерывного культивирования, и содержании его в среде в количестве более 15 %, время ферментации сокращают на 17-25 %.

Экономический коэффициент образования лизина не зависит от методики приготовления посевного материала. Но используя непре­рывный способ, следует помнить, что при длительной работе батареи возможно возникновение ревертантов и утрата свойств продуцентом. Наблюдение за культурой здесь особенно важно.

Инокуляторы или посевные ферментаторы имеют сравнительно простые конструкции. Главное требование - это минимальное коли­чество штуцеров, смотровых окон, люков, отсутствие вращающихся деталей, надежные устройства для герметизации ферментатора. Пер­спективны посевные ферментаторы с пневматическим перемешивани­ем, где диспергирование достигается при введении в ферментатор воздуха через сопло с коническим расширением. Диаметр отверстий сопла от 1 мм в лабораторных до 10 мм в промышленных инокуляторах. Конструкция посевного ферментатора приведена на рис. 1.

Рис. 1. Сопло-конусный ферментатор ФСКА-3 с системой циркуляции и пенога-шеиия:

1 — ввод пены с воздухом в циклон; 2 — посевной штуцер; 3 — светильник; 4 — корпус ферментатора; 5 —манометры; 6 — пароводяная рубашка; 7 — подвод возду­ха; 8 — штуцера для воды, пара и конден­сата; 9 — пробоотборник; 10 и 11 — штуце­ра для термометра и отвода культуральной жидкости; 12 — опора аппарата; 13 — аэра­тор; 14 - обратная труба; 15 - коничес­кий барботер; 16 и 19 — смотровые окна; 17 — циклон; 19 — лопасти пеногасителя; 20 — стеклянная часть циклона; 21 — по­дача питательной среды.

При использовании этого аппарата можно обойтись без химического пено­гасителя.

Готовая посевная культура независимо от способа ее выращива­ния должна быть свободна от фага (для продуцентов из рода Вгеvibacterium), посторонней микрофлоры и иметь титр около 109 клеток на 1 мл.

**Приготовление и стерилизация питательной среды, аппаратов и коммуникаций**

Промышленная технология лизина, разработанная в нашей стране, предусматривает использование питательной среды для выра­щивания продуцентов лизина, состоящей из мелассы, кукурузного экстракта или другого источника ростовых веществ, мела и пеногаси­теля. Однако в связи с дефицитностью мелассы и кукурузного экст­ракта в настоящее время проводится поиск новых дешевых компонен­тов для их частичной или полной замены, обеспечивающих сбаланси­рованность питательной среды для действующих лизиновых заводов.

В качестве заменителей кукурузного экстракта используют фер­ментативный гидролизат БВК, при этом ферментолизат БВК, внесен­ный в питательную среду вместо кукурузного экстракта, должен обес­печить концентрацию аминного азота 0,06 %. В этих условиях уровень биосинтеза лизина культурой Вгеvibacterium 22ЛД (промышленный штамм) на 60 % выше, чем с кукурузным экстрактом (при содержании мелассы по РВ 10 %).

Установлено также, что замена кукурузного экстракта в питатель­ной среде нативной молочной сывороткой (рН 4, РВ 2,5 %, СВ б, NH2 0,05 %) в количестве 0,04 % по аминному азоту обеспечивает выход на 10 % больше, чем регламентная среда. Использование выпаренной молочной сыворотки (рН 3,9, РВ 10,8 %, СВ 25, NH2 0,23 %) в количестве 0,05 % по аминному азоту вместо кукурузного экстракта способ­ствует повышению накопления лизина на 67 %, при этом сокращает­ся расход мелассы за счет молочного сахара, содержащегося в сыво­ротке.

В качестве стимулятора роста культур - продуцентов лизина возможно использование водорослей Fucus vusiculosus, в которых содержатся ростовые вещества группы В по классификации Н. Вильсо­на и В. Гартелиуса. Выход лизина при введении в питательную среду экстракта высушенных и размолотых водорослей увеличивается на 40-50 %.

В нашей стране разработана новая комплексная технологическая схема производства ферментного препарата глюкоамилазы при глу­бинном культивировании гриба Asp. awamori F-122, отходы производ­ства которого используются в качестве питательной среды для произ­водства L-лизина: ультрафильтрат (источник углерода, азота и неор­ганических солей) и мицелий Asp. awamori F-122 (источник органичес­кого азота). Ультрафильтрат после концентрирования ферментного раствора в количестве 964 л на 1 м3 раствора, поступающего на кон­центрирование, ранее сливался в канализацию, а биомасса (мицелий) направлялась на отвал. Состав ультрафильтрата следующий (в %): СВ 5,5-6, РВ 4-4,5, общий азот 0,18-0,2, аминный азот 0,03-0,04. Содер­жание сырого протеина 11 г/л. В биомассе, которая образуется в коли­честве 200-250 кг на 1 м3 культуральной жидкости (при влажности 70 %), содержится до 5 % белка, 0,4-0,5 углеводов, 0,15-0,25 % амино­кислот в большом ассортименте. Культивирование продуцентов лизина Согуn. glutamicum Т-3 и Brevibacterium sp. 22L проводят на пи­тательных средах, приготовленных на основе стерильного ультрафиль­трата с рН 7-7,4, содержанием cахаров 8-12 %, аминного азота 0,08-0,1, общего азота 0,4-0,6 %. Туда же добавляют 2-3 % (по сухой массе) экстракта мицелия Asp. awamori F-122. Выход лизина через 48-50 ч культивирования на такой среде 40-45 г/л.

Обычно питательную среду готовят и стерилизуют в две стадии с учетом свойств компонентов, входящих в ее состав. Стадия подготов­ки и стерилизации среды состоит из смешивания компонентов пита­тельной среды в определенной пропорции с помощью специальных дозаторов в реакторе, растворения солей при перемешивании, нагрева до температуры стерилизации, выдержки при этой температуре и охлаждения до температуры, при которой проводится культивирова­ние продуцента лизина.

В производстве лизина используют мелассу, содержащую термо­лабильный компонент - сахарозу. Поэтому ее стерилизуют отдельно. В реактор, снабженный мешалкой, подают мелассу, нагревают при пос­тоянном перемешивании до температуры 80 °С, разбавляют водой сог­ласно имеющейся рецептуре, затем быстро разогревают глухим паром до температуры 120-122 °С в специальном аппарате и выдерживают при этой температуре определенное время, необходимое для полной гибели микрофлоры. Остальные компоненты среды смешивают также в реакторе с мешалкой и растворяют в воде с подогревом, нагревают в специальном аппарате до температуры стерилизации, выдерживают при этой температуре и охлаждают. Длительность, стерилизации при этом значительно меньше, но температура выше.

Пеногаситель часто стерилизуют отдельно, особенно в том случае, когда им является масло или жир. Режимы стерилизации (температура и длительность) при обработке пеногасителя более жесткие, чем это принято для стерилизации любых питательных сред.

Процесс получения лизина требует строгих асептических условий, и поэтому особое внимание уделяют стерилизации не только среды, но а всех реакторов, коммуникаций, подаваемого воздуха. Режимы сте­рилизации зависят главным образом от материала, из которого изго­товлена аппаратура. Наиболее эффективна обработка аппаратуры и коммуникаций острым паром под давлением при температуре 135—140 °С. Но отдельные блоки аппаратов, в том числе датчики измери­тельных приборов, не выдерживают таких условий стерилизации, и для их обработки применяют "холодные" способы стерилизации. Для такой обработки могут быть использованы бактерицидные газы (эти­лен) и растворы химических реагентов (формалина, смеси цитилпиридинового бромида и этанолмеркурихлорида в соотношении 2:1, раз­личные производные фенола и их смеси, аммонийные соли первичных в вторичных алкилсульфатов, хлорсодержащие соединения, β-пропиоллактон и т. д.). После холодной стерилизации остатки химических реагентов должны быть удалены промывкой стерильной водой.

Степень стерильности среды, оборудования и коммуникаций проверяют следующим образом. Простерилизованную среду или смывы, произведенные стерильной водой с внутренних поверхностей аппаратов и трубопроводов, высевают на агаризованные или жидкие питательные среды и инкубируют в термостате в течение суток. Если среды остаются стерильными, значит, стерилизация проведена пра­вильно. Такой анализ проводят при пуске завода, в случае появления инфекции и периодически в профилактических целях.

**Культивирование продуцента лизина в промышленных ферментаторах**

Выращивание производственной культуры продуцента лизина осу­ществляется, как правило, периодическим способом в ферментаторах. В отличие от аппаратов, используемых при производстве кормовых дрожжей, ферментаторы имеют меньшие габаритные размеры и рассчи­таны на 50, 63 и 100 м3. Все они предназначены для выращивания куль­туры в асептических условиях со строгим соблюдением герметизации процесса. Ферментаторы снабжают необходимыми коммуникациями, системой подачи стерильного пеногасителя, охлаждающими теплооб­менными устройствами и устройствами для перемешивания и введе­ния в питательную среду стерильного воздуха, дополнительных пита­тельных ингредиентов, а также растворов кислот или щелочей для поддержания рН среды на заданном уровне. На рис. 2 представлен общий вид ферментатора для выра­щивания продуцента в асептических условиях

.

Рис. 2. Ферментатор вместимостью 50 м3:

1 — теплообменник; 2 — электродвигатель; 3 — привод мешалки; 4 — соединительная муфта вела; 5 — гильза для термометра; 6 — барботер; 7 — корпус аппарата; 8 — растяжка для центров­ки вале; 9 — лопасти мешалки; 10 — мешалка; 11 — опора аппарата

Стерильную среду в ферментатор вводят при температуре, близкой к температуре выращивания проду­цента (32-35 °С), или около 80 °С. Во втором случае для окончательного охлаждения аппарата и среды ис­пользуют теплообменные устройства самого ферментатора.

При достижении оптимальной температуры среды из посевного ферментатора подают посевной ма­териал и тут же начинают аэрацию со­держимого ферментатора. Коэффициент заполнения аппарата 0,65-0,75 в зависимости от степени ценообразования в данных условиях культивирования.

В ферментаторе устанавливают определенный режим культиви­рования в зависимости от особенностей продуцента. Для продуцентов лизина длительность ферментации составляет 58-72 ч.

В первые сутки микроорганизмы ассимилируют приблизительно 25 % общего азота среды, углеводов и почти все аминокислоты. За это время накапливается почти вся биомасса. Вторая стадия роста культу­ры сопровождается резким замедлением накопления биомассы и самыми высокими скоростями биосинтеза лизина. Питательная среда сильно истощается, изменяется рН. На этой стадии целесообразно проводить подтитровывание среды 25 %-ным раствором аммиака или 15 %-ным раствором NaОН с целью стабилизации рН и дополнительно вводить питательные вещества (подпитка). Последняя стадия выращи­вания продуцента лизина характеризуется некоторой убылью биомас­сы за счет небольшого автолиза клеток и резким снижением скорос­ти накопления лизина.

Как отмечалось выше, на биосинтез лизина существенное влияние оказывают аэрация и перемешивание. Поэтому на всех стадиях процес­са все параметры культивирования строго регламентируются и контро­лируются (температура, рН, изменение основных компонентов среды, накопление лизина, аэрация, перемешивание и т. д.).

Для реализации процесса получения продукта микробиологичес­кого синтеза определяют время начала подачи подпитки, а также из­менения расходов растворов питательных ростовых веществ и сте­рильной воды, обеспечивающие максимизацию производительности аппарата. Например, после рассмотрения физиологической активности культуры Вгеvibacterium 22ЛД в периодическом процессе на питатель­ной среде с ферментолизатом БВК при культивировании в фермента­торе объемом 100 м3 на Шебекинском биохимическом заводе для введения подпитки (40 %-ный раствор мелассы и 1,4 %-ный раствор солей) был выбран период с 12-го по 15-й ч культивирования, который характеризуется наибольшей скоростью лизинообразования. Подачей мелассной подпитки в питательную среду вводили 5-6 % сахаров. За 65 ч культивирования синтезировалось 47 г/л лизина. Выход лизина составлял 31 % по массе введенного сахара.

Готовая культуральная жидкость помимо лизина содержит био­массу продуцента, остатки непотребленных питательных веществ среды, продукты обмена веществ.

**Выделение целевого продукта (L-лизина)**

В зависимости от последующего назначения препарата можно на основе культуральной жидкости получить технические препараты в виде жидкого концентрата лизина (ЖКЛ) и сухого кормового концент­рата лизина (KKJI), а также кристаллический лизин. Для каждого из этих продуктов существует своя технология.

Для кормовых целей целесообразнее получать технические препа­раты ЖКЛ и ККЛ, так как они содержат помимо лизина значительное количество других важных для организма животного соединений, в частности витамины: рибофлавин, пантотеновую, фолиевую и никоти­новую кислоты и др.

Технические препараты лизина получают на основе всей суммы веществ, присутствующих в культуральной жидкости, включая био­массу продуцента и твердые нерастворимые частицы среды. Поскольку культуральная жидкость имеет сравнительно низкое содержание сухих веществ (10-13 %) и не обладает стабильностью при хранении, концентрацию сухих веществ увеличивают методом выпаривания или высушивания. Готовая культуральная жидкость перед концентриро­ванием должна содержать минимальное количество редуцирующих сахаров, так как в процессе концентрирования они могут образовы­вать при участии ε-аминогруппы лизина соединения, не усваиваемые животными, т. е. происходит безвозвратная потеря целевого про­дукта.

Для стабилизации лизина культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до pH 5 и добавляют 25 %-ный раствор метабисульфита натрия в количестве 0,4 %. Далее стабилизированную культураль­ную жидкость выпаривают в вакуум-выпарной установке до концент­рации сухих веществ 35-40 %. Потери лизина на этой операции состав­ляют от 5 до 15 %. Вязкость ЖКЛ 0,648 **.** 10-3 кг/(м **.** с), температура за­мерзания – 18 °С, удельная масса 1,150-1,300, pH 4,5-6.

Жидкий концентрат лизина хорошо сохраняется в течение 3-4 ме­сяца. Считается, что он обладает большей биологической ценностью, чем сухой ККЛ. Для получения сухого ККЛ жидкий концентрат высу­шивают на распылительных сушилках до влажности 5-6 %. Получен­ный ККЛ содержит до 15-20 % лизина в виде монохлоргидрата, около 15-17 % белка, до 14 % других аминокислот, 10-13 % бетаина и около 20-25 % зольных веществ. Но сухой ККЛ, получаемый высушиванием стабилизированной и сконцентрированной культуральной жидкости, имеет недостаток - он очень гигроскопичен (его гигроскопическая точка при 20 °С равна 20-22 % относительной влажности воздуха) и при хранении слеживается. Образующиеся при этом крупные комки зат­рудняют его дальнейшее продуктивное использование как при приготовлении комбикормов, так и непосредственно на животноводческих фермах.

Имеется несколько способов ликвидации этого недостатка. По-ви­димому, большая гигроскопичность сухого препарата связана с высо­ким содержанием сахаров и органических кислот, которое можно снизить введением в культуральную жидкость наполнителей (костной муки, оксида кальция, бентонита, пшеничных отрубей) и последую­щей сушкой. В результате получается сыпучий менее гигроскопичный продукт.

Известен метод выращивания на готовой культуральной жидкос­ти, содержащей лизин, специальных видов дрожжей, усваивающих углеводы и органические кислоты. Из культуральной жидкости исче­зают нежелательные компоненты (сахара и органические кислоты), и она дополнительно обогащается кормовым белком (дрожжи).

При такой технологии ККЛ получается менее гигроскопичным и более сыпучим. Жидкий и сухой концентраты лизина приблизительно одинаковы по своему составу, если приготовлены без наполнителей. Если же вводят наполнители, к сумме сухих веществ культуральной жидкости прибавляют еще и их сухие вещества.

На основе готовой культуральной жидкости можно получать кристаллические препараты лизина. Первым этапом в этой технологии является освобождение от твердой взвеси центрифугированием и получение фильтрата культуральной жидкости, из которой лизин извлекают с помощью ионообменной смолы КБ-4П-2 или КУ-2. Сорбция лизина осуществляется на катионит в аммонийной форме

Лизин + 2 (NН4+) • Катионит → (2 NН4 +) + (Лизин+2) • Катионит.

Затем колонки тщательно промывают до бесцветной промывной воды и осуществляют элюцию лизина с катионита 0,5-5 %-ным раствором аммиака до отсутствия следов лизина в последних порциях стекающего элюата и получают 1-2 %-ный раствор лизина. В элюат переходит 80-90 % сорбированного лизина. Десорбция лизина проте­кает по следующей схеме

(Лизин +2) • Катионит + (2 NН4 +) → Лизин+2 + 2 (2 NН4 +) • Катионит.

Помимо лизина элюат содержит значительное количество аммиа­ка, который удаляют при нагревании, а освобожденный от аммиака элюат подкисляют соляной кислотой до рН 4,9-5 и выпаривают в вакуум-выпарном аппарате при температуре 60 °С до концентрации лизина 30-50 %. При взаимодействии лизина с соляной кислотой образуется монохлоргидрат лизина, который выпадает при охлажде­ния до температуры 10-12 °С из концентрата в виде желтоватых кристаллов. Последние отделяют от маточного раствора и, если пред­полагается использовать лизин для кормовых целей, высушивают и фасуют, маточный же раствор отправляют на повторное концентриро­вание для утилизации оставшегося в нем лизина. Если предполагается получение высокоочищенных препаратов лизина, кристаллы первой ступени выделения подвергают многостадийной очистке от красящих веществ и других примесей. Перекристаллизацию лизина проводят из раствора в этиловом спирте. Очищенный лизин используют для пище­вых, медицинских и других целей. Товарный продукт содержит не менее 97 % основного вещества - L-лизина дигидромонохлоргидрата. Влажность продукта не выше 0,5 %, зольность до 0,3. Выпускают его в виде малогигроскопичного порошка белого или бледно-кремового цвета, без запаха, горько-соленого вкуса.

Потери лизина в процессе выделения кристаллического препарата составляют около 30 %.

Завершается процесс производства лизина любой степени чистоты фасовкой, упаковкой и складированием готового продукта. Фасуют препараты в полиэтиленовые мешки, которые герметизируют и допол­нительно упаковывают в крафт-мешки или в случае кристаллического препарата - в картонные коробки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология: Учеб. Пособие для вузов. В 8 кн./Под Б 63 ред. Н. С. Егорова. В. Д. Самуилова. Кн. 6: Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов/Быков В. А., Крылов И. А., Манаков М. Н. и др. – М.: Высш. шк., 1987. – 143 с.: ил.

2. Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология, М., ВО Агропромиздат. 1990.

3. Биотехнология // Под ред. А. А. Баева. – М.: Наука, 1984. С. 311