

Univerza v Ljubljani



RESPONS
RES - PONS d.o.o.



Javni študijski, razvojni,
invalidski in preživetinski
sklad Republike Slovenije



REPUBLIKA SLOVENIJA
**MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,
ZNANOST IN ŠPORT**



EVROPSKA UNIJA
EVROPSKI
SOCIALNI SKLAD
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST

Projekt sofinancirata Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.

IZOLIRANE AMINOKISLINE MED PREHRANSKIMI DOPOLNILI

Martina Puc

Manca Groznik

Natalija Pavlinjek

Mojca Korošec

Tatjana Robič Pikel

Izolirane aminokisliline med prehranskimi dopolnili

Avtorice: Martina Puc, Manca Groznik, Natalija Pavlinjek, Mojca Korošec, Tatjana Robič Pikel

Tehnična urednica: Meta Galjot

Izdal in založil: Založba COVIRIAS, Parmova 14, 1000 Ljubljana

pretehtajte.si, telefon: 01 23 22 097, info@covirias.si

Ljubljana, avgust 2019

1. izdaja

Brezplačna publikacija

Publikacija je izdana v elektronski obliki v formatu pdf.

Publikacija je objavljena na spletni povezavi: pretehtajte.si

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID=301395968

ISBN 978-961-94432-6-2 (pdf)

KAZALO

1 UVOD	4
2 POIMENOVANJE	6
3 GLAVNI POSTOPKI PRIDOBIVANJA IZOLIRANIH AMINOKISLIN	8
3.1 EKSTRAKCIJA IZ PROTEINSKIH HIDROLIZATOV	11
3.1.1 Kislinska hidroliza	12
3.1.2 Alkalna hidroliza	13
3.1.3 Encimska hidroliza	13
3.2 KEMIČNA SINTEZA	14
3.3 MIKROBIOLOŠKE METODE	15
3.3.1 Encimska pretvorba	15
3.3.2 Fermentacija s pomočjo mikroorganizmov	16
3.4 SUBLIMACIJA	17
3.5 PRIMERJAVA POSTOPKOV PRIDOBIVANJA	18
4 POSTOPKI PRIDOBIVANJA ZA POSAMEZNE AMINOKISLINE	20
4.1 L- ALANIN	20
4.2 L- ARGININ	20
4.3 L- ASPARAGINSKA KISLINA	21
4.4 L- CISTEIN	21
4.5 L- FENILALANIN	21
4.6 L- HISTIDIN	21
4.7 L- GLUTAMIN	21
4.8 L- GLUTAMINSKA KISLINA	22
4.9 L- LIZIN	22
4.10 L- METIONIN	23
4.11 L- PROLIN	23
4.12 L- SERIN	23
4.13 L- TREONIN	24
4.14 L- TRIPTOFAN	24
4.15 BCAA	24
5 ANALIZNE METODE ZA UGOTAVLJANJE NEČISTOČ V PROIZVODNJI AMINOKISLIN	27
5.1 METODE ZA DOLOČANJE NEČISTOČ AMINOKISLIN	28
5.1.1 Tankoplastna kromatografija	28
5.1.2 Analiza aminokislin	28
5.1.3 UV spektroskopija	29
6 ZAKLJUČEK	30
7 VIRI IN LITERATURA	32

1 UVOD

Ustrezen vnos dušika in esencialnih aminokislin naj bi si človek zagotovil z ustrežno beljakovinsko prehrano, za katero se priporočajo dnevni vnosi (EFSA, 2012). Tak pristop je po mnenju strokovnjakov bolj praktičen, čeprav človek v resnici nima potreb posebej po beljakovinah, ampak ima zaradi intenzivne lastne sinteze različnih beljakovin dejansko potrebe po dušiku in esencialnih aminokislinah (Richter in sod., 2019).

Pa vendar se že več kot deset let tržijo prehranska dopolnila s posameznimi aminokislinami ali njihovimi mešanicami v večkomponentnih in multikomponentnih izdelkih¹ in se v bazi P3/P3 Professional² nahajajo v posebni kategoriji³ *Aminokislinae*. V tej kategoriji je posebej prisotna dilema, ali gre za dopolnjevanje (nepopolne) prehrane in s tem za prehranska dopolnila, kot jih definiramo v Evropski uniji (Direktiva 2002/46/ES) ali za bogatenje sicer že ustrezne prehrane z dodajanjem hranil. Zato besedna zveza »prehranski dodatek« nikakor ni sinonim besedni zvezi »prehransko dopolnilo«. V tem smislu je potrebno razumevanje angleške besedne zveze »Dietary supplement«, ki temelji na ameriški zakonodaji, ki ni sinonim za »Food supplement«.

Pri aminokislinah moramo biti tudi pozorni na informacijo, ali gre za glavno sestavino živila, npr. prehranskega dopolnila, ali gre za sestavino, ki je v izdelku sekundarnega pomena, to pomeni, da je v njem kot npr. aroma oziroma aditiv (Uredba (ES) št. 1333/2008), ali pa imamo morebiti živilo, ki je vir aminokislin. Neko prehransko dopolnilo je lahko prisotno v kategoriji *Aminokislinae* oziroma vanjo sodi, vendar končnega izdelka ne smemo zamenjevati s samo surovino, ki je kot ena od sestavin vikorporirana v prehransko dopolnilo kot končni izdelek. Tako pričakujemo, da je v sestavi končnega izdelka navedeno, kakšno količino neke aminokislinae vsebuje ali pa, kakšno količino beljakovine vsebuje z navedbo deleža posameznih aminokislin v njej, da potrošnik ve, kaj bo pravzaprav zaužil.

Proizvodnja izoliranih aminokislin se je v zadnjih desetletjih razvila tako, da lahko izbiramo med hidrolizo beljakovin, kemijsko oziroma encimsko sintezo ali biotehnologijo. Gre za tako

¹ Enokomponentna prehranska dopolnila vsebujejo eno glavno sestavino. Večkomponentna prehranska dopolnila vsebujejo več različnih glavnih sestavin iz ene P3 kategorije. Multikomponentni izdelki vsebujejo različne glavne sestavine iz različnih P3 kategorij. Segmentacija prehranskih dopolnil na enokomponentne, večkomponentne in multikomponentne izdelek je avtorsko delo Martine Puc.

² Bazo podatkov o prehranskih dopolnilih na slovenskem trgu P3/P3 Professional vzdržuje družba RES- PONS d.o.o. in je dostopna na www.pretehtajte.si. Avtorske pravice so pridržane.

³ Avtorica P3 kategorij in sistema P3 Professional je Martina Puc. Avtorske pravice opredelitve kategorij so pridržane.

različne pristope, da ima vsak od njih različna potencialna tveganja, kar je pomembno pri oceni varnostnih profilov posameznih izdelkov. Zato jih je potrebno poznati in razumeti.

Dve izmed ključnih težav pri prodaji predelanih izdelkov sta napačna označitev in ponarejanje oz. zamenjava vmesnih surovin (Ang, 2009). V praksi se srečujemo z dvoumnimi navedbami, ko ni jasno, ali izdelek vsebuje beljakovine, ki so bogate z določenimi aminokislinami, ali pa dejansko navedene izolirane aminokislino. To je le eden od razlogov, zakaj je poleg razvoja proizvodnih metod potreben napredek tudi na področju analiznih metod aminokislin.

Vidik varnosti ima pri aminokislinah več dimenzij tudi v odvisnosti od namena uporabe. V prehranskih dopolnilih kot takih je vedno v ospredju koncentracija glavne sestavine, pri uporabi aminokislin kot arom oziroma aditivov živil tako za ljudi kot živali pa moramo misliti še na nezavedno uporabo in posledice, ki jih ta prinese (EFSA, 2014).

2 POIMENOVANJE

Aminokislina imajo značilno zgradbo, pri kateri so na centralni ogljikov atom (α -ogljik) vezani vodikov atom, karboksilna skupina (-COOH), aminska skupina (-NH₂) in stranska veriga, ki jo označujemo s črko R. Ker so funkcionalne skupine vezane na α -ogljikov atom (prvi ogljikov atom), te aminokislina pogosto imenujemo tudi α -aminokislina (Boyer, 2005). Pri poimenovanju je potrebno z grško črko (α) označiti, na kateri ogljikov atom so vezane funkcionalne skupine (Vickery, 1947). Z izjemo glicina (R=H), so na tetraedrični α -ogljik preostalih aminokislin vezani štiri različni atomi oz. skupine, kar pomeni, da predstavlja α -ogljik kiralni center in omogoča optično aktivnost. Posledica kiralnega centra sta dva stereoizomera, ki sta zrcalni sliki drug drugega, razlikujeta se namreč le glede na položaj amino skupine (NH₃⁺) (Boyer, 2005). Za označevanje razlike med stereoizomeri glede na položaj amino skupine uporabimo veliki tiskani črki D- (desnosučne) oz. L- (levosučne) (Vickery, 1947). Vse aminokislina, razen glicina, so optično aktivne, kar pomeni, da raztopine čistih stereoizomerov sučejo ravnino linearno polarizirane svetlobe. Aminokislina razdelimo v skupine glede na stranske verige, ki se med seboj razlikujejo po velikosti, polarnosti, naboju in kemijski reaktivnosti. Vsaka aminokislina je natančno določena z imenom, strukturo, ter z eno- in tričrkovnim zapisom (Boyer, 2005; Tabela 1). Enočrkovno poimenovanje je leta 1965 uvedla Margaret Oakley Dayhoff, ki velja za začetnico moderne bioinformatike. Pri aminokislinah, ki se edine začnejo na določeno začetnico, je le-ta njihov simbol za označevanje (npr. cistein, histidin, izolevcin, metionin, serin, valin). Kjer začetnica ni edinstvena, imajo prednost aminokislina, katerih pojavnost v proteinih je pogostejša (alanin, glicin, levcin, prolin, treonin). Za preostale aminokislina uporabimo fonetično izbiro (arginin, fenilalanin, tirozin, triptofan) ter preostale črke (asparagin, aspartat, glutamat, glutamin, lizin) (Dayhoff, 1965). Tabela 1 (str. 7) prikazuje 20 osnovnih aminokislin, njihovo slovensko in angleško poimenovanje ter enočrkovno in tričrkovno označevanje.

Na osnovi kemijske reaktivnosti in polarnosti stranske verige R so aminokislina razvrščene v tri skupine (Boyer, 2005):

1. Aminokislina z nepolarnimi stranskimi verigami

V prvo skupino uvrščamo naslednje aminokislina: glicin, alanin, valin, levcin, izolevcin, prolin, fenilalanin, metionin in triptofan. Vse imajo alifatske oz. aromatske stranske verige. Za aromatske verige je značilno, da so ciklične spojine s konjugiranimi nenasičenimi vezmi, ki pripadajo več kot dvema atomoma hkrati, kar poveča stabilnost spojine. Alifatske spojine so organske spojine ogljika in vodika, ki ne vsebujejo aromatskih obročev, po obliki se delijo na aciklične (odprte verige) in ciklične (oblika obroča) molekule. Verige aminokislinam dajejo hidrofoben značaj, kar pomeni, da odbijajo vodo. Stranske verige so v glavnem enostavni ogljikovodiki, ki kemijsko niso posebno reaktivni.

2. Aminokisliline s polarnimi, nenabitimi stranskimi verigami pri fiziološkem pH

Aminokisliline, ki jih uvrščamo v drugo skupino, so: serin, cistein, treonin, tirozin, asparagin in glutamin. Podrobnejši vpogled v njihove stranske verige nam razkrije širok spekter funkcionalnih skupin. Njihova skupna značilnost je prisotnost heteroatoma (N, O ali S), ki s svojim elektronskim parom omogoča nastanek vodikovih vezi z molekulo vode ali s katero drugo molekulo.

3. Aminokisliline s polarnimi, nabitimi stranskimi verigami pri fiziološkem pH

Asparaginska kislina, glutaminska kislina, histidin, lizin in arginin so aminokisliline, ki jih uvrščamo v tretjo skupino. Sem spadajo aminokisliline s polarnimi ter pri fiziološkem pH nabitimi stranskimi verigami.

Tabela 1: Slovensko in angleško poimenovanje aminokislin ter njihov enočrkovni in tričrkovni zapis (povzeto po Boyer, 2005).

SLOVENSKO POIMENOVANJE	ANGLEŠKO POIMENOVANJE	ENOČRKOVNI ZAPIS	TRIČRKOVNI ZAPIS
Alanin	Alanine	A	Ala
Arginin	Arginine	R	Arg
Asparagin	Asparagine	N	Asn
Aspartat	Aspartate	D	Asp
Cistein	Cysteine	C	Cys
Fenilalanin	Phenylalanine	F	Phe
Glicin	Glycine	G	Gly
Glutamat	Glutamate	E	Glu
Glutamin	Glutamine	Q	Gln
Histidin	Histidine	H	His
Izolevcin	Isoleucine	I	Ile
Levcin	Leucine	L	Leu
Lizin	Lysine	K	Lys
Metionin	Methionine	M	Met
Prolin	Proline	P	Pro
Serin	Serine	S	Ser
Tirozin	Tyrosine	Y	Tyr
Treonin	Threonine	T	Thr
Triptofan	Tryptophan	W	Trp
Valin	Valine	V	Val

3 GLAVNI POSTOPKI PRIDOBIVANJA IZOLIRANIH AMINOKISLIN

Aminokislina so ključni gradniki proteinov, obenem pa so vključene v regulacijo pomembnih presnovnih poti in procesov, ki so ključni za rast in vzdrževanje organizma. Začetki pridobivanja aminokislin segajo v leto 1908, ko so na Japonskem z ekstrakcijo iz kislih hidrolizatov proteinov izolirali mononatrijev glutamat (Ikeda, 1908). Mononatrijev glutamat je bil izoliran iz alge Kombu (*Saccharina japonica*), ki je tradicionalna začimba na Japonskem (Kusumoto, 2001). Izolat iz alg so najprej uporabljali kot ojačevalec okusa, proces pa štejemo kot prvo industrijsko pridobivanje aminokislin. Pomanjkljivost industrijskega procesa so predstavljale visoke cene začetnih surovin in negativen vpliv na zdravje zaposlenih, okolje in same proizvodne naprave zaradi uporabe velikih količin klorovodikove kisline (Nakamori, 2016).

Na trgu je na voljo vseh 20 aminokislin, ki se med seboj razlikujejo po razširjenosti. Po nekaterih podatkih se v največjih količinah proizvajajo glutaminska kislina, metionin in lizin (Ikeda, 2003). Tabela 2 prikazuje letno proizvodnjo vsake izmed aminokislin ter metode njihovega pridobivanja.

Tabela 2: Svetovna proizvodnja aminokislin glede na količino in metodo pridobivanja (povzeto po Ikeda, 2003).

AMINOKISLINA	KOLIČINA (ton/leto)	METODE
L- glutamat	1000000	Fermentacija
D-, L- metionin	350000	Kemična sinteza
L- lizin	250000	Fermentacija
glicin	22000	Kemična sinteza
L- fenilalanin	8000	Fermentacija, sinteza
L- asparaginska kislina	7000	Encimska sinteza
L- treonin	4000	Fermentacija
L- cistein	1500	Ekstrakcija, encimska sinteza
D, L- alanin	1500	Kemična sinteza
L- glutamin	1300	Fermentacija
L- arginin	1200	Fermentacija
L- triptofan	500	Fermentacija, encimska sinteza
L- valin	500	Fermentacija
L- levcin	500	Fermentacija, ekstrakcija
L- alanin	500	Encimska sinteza
L- izolevcin	400	Fermentacija
L- histidin	400	Fermentacija
L- prolin	350	Fermentacija
L- serin	200	Fermentacija
L- tirozin	120	Ekstrakcija

Aminokislina se uporabljajo v mnogih industrijskih produktih, kot so živilski aditivi, dodatki živalski krmi (lizin, metionin, treonin, triptofan), ojačevalci okusa v prehrani ljudi (glutaminska kislina, glutamat, serin, asparaginska kislina, arginin) ali kot sestavine v kozmetičnih in medicinskih izdelkih. Obenem pomanjkanje aminokislin lahko vodi v razvoj različnih bolezni tako pri ljudeh kot pri živalih. Zato se je zanimanje za razvoj novih poti za njihovo proizvodnjo v zadnjih letih znatno povečalo (D'Este in sod., 2018). Glavni proizvajalci aminokislin delujejo na Japonskem, na Kitajskem, v Združenih državah Amerike ter v Evropi. Industrijska proizvodnja aminokislin je prevzela pomembno vlogo v svetovni kemični industriji (Ikeda, 2002).

Aminokislina lahko pridobimo na dva načina. Lahko jih sintetiziramo s pomočjo različnih metod ali pa jih izoliramo iz naravnih produktov. Zgodovinsko gledano je izolacija aminokislin povzročila tudi njihovo sintezo. Leta 1820 Braconnot iz želatine, hidrolizata žveplove kisline, izoliral glicin. Proust pa je iz vodnega ekstrakta fermentiranega glutena izoliral levcin. Leta 1899 je Wollstone dokazal, da lahko iz hidrolizata proteinov izoliramo aminokislino, ki vsebuje žveplo, to je cistein. Te metode so podlaga za postopek izolacije aminokislin, ki se uporablja še danes (Fruton, 1947).

Ko hočemo pripraviti znatno količino aminokislin, moramo najprej ugotoviti, katero izmed glavnih dveh metod izbrati, izolacijo ali sintezo. Pri tem je potrebno upoštevati, da so naravno prisotne aminokislina (z izjemo glicina) optično aktivne (Fruton, 1947). Izolirane aminokislina iz proteinskih hidrolizatov imajo L- konfiguracijo, večina aminokislin izoliranih iz proteinov in nasploh v naravi ima namreč L- konfiguracijo. Pri izbiri je potrebno upoštevati tudi to, da je količina racemata, ki nastane ob hidrolizi proteina, običajno majhna. Racemat je mešanica obeh enantiomer, kar pomeni, da sta spojini kot zrcalni sliki in da gre za optična izomera. Dobljen hidrolizat pa lahko ločimo s prekristalizacijo. To je metoda čiščenja, pri kateri izkoriščamo specifično odvisnost topnosti od temperature. Tudi s sintezo dobimo racemat aminokislin, vendar to lahko preprečimo tako, da za izhodni material uporabimo optično aktivne aminokislina in poskrbimo, da med sintezo ne pride do racemizacije. Racemizacija je proces, pri katerem se čisti (samo L- ali samo D-) enantiomeri pretvorijo v zmes enantiomer (zmes L- in D-) bodisi s segrevanjem, fotokemično ali s kemičnimi reagenti.

Ločitev racemata oz. D- in L- enantiomer aminokislin je pogosto težavna in dolgotrajna naloga. Za ločitev različno konfiguriranih aminokislin se izkorišča stereokemijsko specifičnost encimov. Aminokislina, ki so desnosučne (D-), lahko uničimo z D aminske oksidazo, in tako dobimo samo levosučne (L-) aminokislina. Ta postopek se uporablja pri pripravi L- alanina in L- metionina. Za ločitev racemata se uporabljajo tudi proteolitičnih encimi, ki jih najdemo v

papainu. Papain je encim, ki ga najdemo v papaji. Ta metoda se uporablja za pripravo D-serina in D-levcina.

Nekatere aminokislino pa lahko zlahka izoliramo v čisti obliki predvsem zaradi njihove topnosti. Cistein lahko izoliramo iz kislih hidrolizatov volne ali las. Tudi tirozin lahko zaradi njegove netopnosti zlahka izoliramo iz proteina kazeina ali iz koruznega glutena. L-glutaminska kislina je v visokih koncentracijah prisotna v hidrolizatih večine rastlinskih proteinov, v nekaterih primerih predstavlja od 40 do 50 % vseh aminokislin v rastlini. Neposredno iz proteinskih hidrolizatov se lahko izolira tudi L-levcin. Če je dobljen proteinski hidrolizat nevtraliziran, se levcin obori z netopnimi aminokislinami (Fruton, 1947).

Proizvodni procesi aminokislin lahko potekajo na različne načine, na splošno pa jih lahko razvrstimo v tri skupine (D'Este in sod., 2018):

- ekstrakcija iz proteinskih hidrolizatov,
- kemična sinteza,
- mikrobiološke metode, ki jih nadalje delimo:
 - encimska pretvorba,
 - fermentacija s pomočjo mikroorganizmov.

Poleg navedenih metod lahko aminokislino pridobivamo tudi z metodo sublimacije.

S pomočjo teh metod lahko danes pripravimo vse L-aminokislino. Za proizvodnjo posamezne aminokislino se vedno izbere ekonomsko najbolj ugodna metoda. Prednosti vsake metode so odvisne od številnih dejavnikov, kot so ekonomika procesa, razpoložljivost surovin, velikost trga, okoljska ureditev itd. Metode proizvodnje se med aminokislinami razlikujejo. Sprva se je za proizvodnjo aminokislin uporabljala izključno metoda ekstrakcije iz proteinov, ki se pri proizvodnji nekaterih aminokislin, kot so L-cistein, L-levcin in L-tirozin, uporablja še danes, pri večini pa so to metodo nadomestile mikrobiološke metode. Metoda ekstrakcije je težko zadovoljila potrebe trga po velikih količinah aminokislin, saj je ta metoda odvisna od razpoložljivosti naravnih virov, bogatih s proteini (lasje, keratin, peresa, soja) (Ikeda, 2002).

V nadaljevanju so predstavljene značilnosti vsake izmed metod ter njihova primerjava. Metode pridobivanja si sledijo glede na zgodovinsko odkritje in začetek njihove uporabe v proizvodnji. Prva so začeli uporabljati ekstrakcijo iz kislih hidrolizatov proteinov, sledila je kemična sinteza, nazadnje pa še metoda encimske sinteze in fermentacijske tehnike (Nakamori, 2016).

3.1 EKSTRAKCIJA IZ PROTEINSKIH HIDROLIZATOV

Ekstrakcija iz končnih produktov hidrolize proteinov je primerna za proizvodnjo velikih količin aminokislin, vendar le nekaterih vrst aminokislin, kot so L- asparagin, L- cistein, L- levcin in L- tirozin (Ikeda, 2003). Metoda deluje na osnovi razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih aminokislin, kot sta afiniteta in pH. Na podlagi teh razlik lahko aminokislino med seboj ločimo. Proteini se tako razgradijo v osnovne gradnike – aminokislino (Zhang in sod., 2016).

Določitev aminokislinske sestave polipeptida je relativno kompleksen analitski postopek, ki je sestavljen iz dveh korakov. Prvi korak je popolna hidroliza substrata, kjer se protein razgradi na osnovne gradnike – aminokislino – nato pa sledita kromatografska analiza in kvantifikacija sproščenih aminokislin. Hidroliza je zelo pomemben korak in predpogoj za uspešno analizo izoliranih aminokislin. Vendar kljub njeni pomembnosti še vedno ne obstaja enotna metoda hidrolize za vse ostanke, tako je hidroliza del, ki je najmanj nadzorovan v celotni analizi (Fountoulakis in sod., 1998).

Proteinsko hidrolizo izvedemo z uporabo kisline (6 M HCl in 110 °C), baze (6 M NaOH in 110 °C), vode (v sub- in superkritičnih pogojih) ali encimov. Med kislinsko ali alkalno hidrolizo se vse peptidne vezi prekinejo in v kratkem času (24 h) poteče popolna hidroliza proteinov. To je eden od prednostnih postopkov za hidrolizo rastlinskih proteinov. Glavne pomanjkljivosti tega postopka so, da s to metodo ne moremo izolirati asparaginske in glutaminske kisline, saj se popolnoma uničita in pride do racemizacije aminokislin (Ramakrishnan in sod., 2013). Na popolnost postopka hidrolize vplivajo temperatura, čas, sredstva za hidrolizo in aditivi (Fountoulakis in sod., 1998). Raziskave kažejo, da se izkoristek pridobivanja aminokislin poveča s temperaturo in časom trajanja hidrolize. Višja temperatura je povezana s povečano disociacijsko konstanto vode, posledično se poveča koncentracija vodikovih in hidroksidnih ionov, ki razcepijo peptidne vezi (D'Este in sod., 2018). L- levcin, L- alanin in L- serin pridobivamo pri temperaturah od 180 do 320 °C in pri tlaku 3 do 30 MPa. Največji izkoristek pa avtorji poročajo pri temperaturah od 200 do 290 °C in pri trajanju reakcije od 5 do 10 min (Cheng in sod., 2008). Višja temperatura zaradi znižanja dielektrične konstante vode omogoča uporabo vode namesto organskih topil, kar je okolju prijaznejše (Pourali in sod., 2009). Glavna pomanjkljivost te metode je dejstvo, da so reakcije odvisne od razpoložljivosti naravnih virov proteinov, kar lahko omejuje naraščajoče potrebe po pridobivanju aminokislin (D'Este in sod., 2018).

Te tri hidrolizne metode, ki vključujejo uporabo kislin, baz ali encimov predstavljajo razpoložljive postopke za enostavno pretvorbo proteinov v njihove sestavne dele, aminokislino (Fruton, 1947). Glede na zeleno aminokislino lahko uporabimo več vrst

ekstracij. L- cistein lahko pridobimo z ekstrakcijo s pomočjo aktivnega oglja in koncentrirane klorovodikove kisline (Renneberg, 2008).

Hidroliza peptidnih vezi v proteinu in posledično sproščanje aminokislin, ki ta protein gradijo, je prvi in najmanj težaven proces pri izolaciji aminokislin. Pridobljeni hidrolizati proteinov predstavljajo kompleksno mešanico različnih aminokislin, ki jih je potrebno izolirati v čisti obliki (Fruton, 1947). Za določanje aminokislinske sestave se uporabljajo naslednje analize metode:

- plinska kromatografija,
- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti,
- adsorpcijska kromatografija,
- ionsko – izmenjevalna kromatografija (Anderluh in sod., 2009).

Poleg teh splošnih metod so na voljo številni postopki za določitev posamezne aminokislinske, kot je uporaba periodata za ocenjevanje prisotnosti serina in treonina, kolorična metoda za ocenjevanje prisotnosti histidina, triptofana in tirozina ter obarvanje za ocenjevanje prisotnosti histidina in arginina (Fruton, 1947).

3.1.1 Kislinska hidroliza

Kislinska hidroliza proteinov je še danes ena najbolj razširjenih in uporabljenih metod za izolacijo aminokislin; žveplovo kislino, ki so jo uporabljali v preteklosti, pa je zamenjala mešanica klorovodikove in mravljične kisline (Fruton, 1947).

Obdelava s klorovodikovo kislino je najpogostejši postopek hidrolize, predvsem zaradi priročnosti uporabe tega reagenta, saj ga lahko uporabimo tako v tekočem kot v plinskem agregatnem stanju in ga nato uparimo, tako da hidrolizat dodamo v majhen volumen pufru za rekonstitucijo. Kislinska hidroliza se lahko izvede že z majhnimi količinami substrata, kar je pogosto kritičen dejavnik, če so na voljo le omejene količine vzorca proteinov. Pri običajni kislinski hidrolizi se uporablja 6 M HCl, od 20 do 24 ur pri 1180 °C v vakuumu.

Kislinska hidroliza proteinov pa ni uporabna za vse aminokislinske in s to metodo ne moremo izolirati nekaterih pomembnih aminokislin (Fruton, 1947). V pogojih običajne kislinske hidrolize se aspargin popolnoma hidrolizira v asparginsko kislino, glutamin pa v glutaminsko kislino. Triptofan se uniči in ga ne moremo izolirati. Tudi serin in tirozin se delno hidrolizirata in običajno pride od 5 do 10 % izgube teh aminokislin. Iz hidroliziranega vzorca kisline ne

moremo posredno določiti cisteina. Tirozin se delno uniči zaradi nečistoč, ki so prisotne v agensu hidrolize. Večina aminokislin se med postopkom hidrolize izgubi, največja stopnja izgube je opazna pri cisteinski kislini in serinu. Da bi izgube preprečili, se v raztopino vzorca dodajajo zaščitna sredstva kot so fenol, tioglikolna kislina, merkaptoetanol, indol in triptamin (Fountoulakis in sod., 1998).

Zaporedje aminokislin v proteinu je zelo pomembno za hidrolizo in njeno uspešnost. Stranske verige med alifatskimi ostanki vplivajo na stopnjo odvijanja, najtežje se namreč prekinajo vezi med alifatskimi aminokislinami, saj so te vezi še posebej odporne na hidrolizo in se cepijo v nekoliko nižjih odstotkih (50 do 70 %) pri enakih pogojih kot vezi med ostalimi aminokislinami. Primer so vezi levcin – levcin, valin – valin in levcin – valin. Za cepitev teh vezi je potreben daljši čas hidrolize (od 92 do 120 ur). Med takšno dolgotrajno hidrolizo pa lahko pride do izgub ostalih aminokislin.

Če za kislinsko hidrolizo s klorovodikovo kislino namesto tekoče faze uporabimo plinsko fazo, dobimo podobne rezultate. Prednost uporabe plinske faze je, da se zmanjša uporaba hidroliznega sredstva, kar posledično zmanjša stopnjo onesnaženja, pa tudi ta, da se lahko za izvedbo metode uporabljajo posebno izdelane posode za hidrolizo, ki omogočijo sočasno hidrolizo večjega števila vzorcev (Fountoulakis in sod., 1998).

3.1.2 Alkalna hidroliza

Metode alkalne hidrolize ne moremo uporabiti za izolacijo serina, treonina, arginina in cisteina, saj se ti med postopkom uničijo. Vse ostale aminokislino pa dobimo v racemizirani obliki. Metoda se običajno izvaja z NaOH, KOH ali BaOH, pri čemer je uporaba slednje baze redkejša. Alkalna hidroliza se skoraj izključno uporablja za izolacijo triptofana, pa tudi, če je v vzorcu proteina, ki ga hidroliziramo, prisotno veliko ogljikovih hidratov, kar pogosto zasledimo pri živilih in farmacevtskih raztopinah proteinov. Le-ti pogosto vsebujejo visok delež monosaharidov (Fountoulakis in sod., 1998).

3.1.3 Encimska hidroliza

Encimsko hidrolizo izvedemo s pomočjo proteaz, ki prekinajo peptidne vezi med aminokislinami. Uporabo tega postopka v velikem obsegu ovirajo:

- specifičnosti proteaz za cepitev peptidnih vezi,
- potrebna kombinacija proteaz za celoten proces hidrolize proteinov in
- daljši inkubacijski čas (od 24 do 48 ur) (Ramakrishnan in sod., 2013).

Prednost uporabe encimske hidrolize je, da omogoča določitev in izolacijo asparginske in glutaminske kisline, ne da bi med hidrolizo prišlo do preoblikovanja njenih stranskih verig kot se sicer zgodi med kemično razgradnjo. Med postopkom pa tudi ne pride do racemizacije aminokislin (Fountoulakis in sod., 1998).

V eni izmed študij D'Aniello in sod. navajajo postopek za hidrolizo, ki obsega 15 minut kemične razgradnje s 6 M HCl pri 80 do 90 °C ali pa kemično razgradnjo, ki traja 1 dan pri 37 °C. Sledi encimska hidroliza s pronazo (encim, ki ga pridobijo iz liofilizirane bakterije vrste *Streptomyces griseus*) za 12 do 16 ur pri 50 °C. Temu nato sledi še razgradnja z levcin aminopeptidazo in peptidil-D-amino kislinsko hidrolazo za 24 ur. Celotna hidroliza je tako dosegla 97 do 100 % izkoristek in racemizacija je bila manjša od 0,002 % (D'Aniello in sod., 1993).

3.2 KEMIČNA SINTEZA

Vse znane aminokisliline, z izjemo hidroksilizina, ki je bil odkrit v želatini in drugih proteinih, znamo sintetizirati (Fruton, 1947).

Z metodo kemične sinteze lahko proizvedemo aminokisliline z D, L- konfiguracijo. Pri tej metodi kot substrat uporabljamo sladkorno peso ali akrilonitril. Prednost te metode je kontinuiran način proizvodnje v zelo velikem obsegu. Produkt je racemat D- in L- oblike aminokislin, kar predstavlja slabost metode. Za ločitev racemata je potreben drag proces, ki izkorišča optično ločljivost (Ramakrishnan in sod., 2013). Kemična sinteza je v preteklosti predstavljala enega izmed osnovnih načinov pridobivanja akiralnih aminokislin, kot so glicin in racemat D- in L- metionina ter D- in L- alanina (D'Este in sod., 2018).

S kemično sintezo pridobivamo aminokislino metionin, ki jo uvrščamo med najpogostejše aminokisliline, ki se uporabljajo v prehranskih dopolnilih. Poleg D- in L- metionina lahko s kemično sintezo pridobivamo še glicin ter D- in L- alanin (Nakamori, 2016). V velikih količinah pa se ta metoda uporablja še za proizvodnjo glutaminske kisline (Ramakrishnan in sod., 2013) iz akrilonitrila, ogljikovega monoksida in vodikovega cianida (Nakamori, 2016).

3.3 MIKROBIOLOŠKE METODE

Aminokislina lahko pridobimo tudi z biološkimi procesi, kamor sodita encimsko katalizirana sinteza in fermentacija (D'Este in sod., 2018). Stroški take izolacije aminokislin so odvisni od vira ogljika, procesa čiščenja in v primeru fermentacije, od njenega donosa.

3.3.1 Encimska pretvorba

Encimske metode se uporabljajo v industrijah majhnega obsega za proizvodnjo sintetičnih D- in L-aminokislin (Ramakrishnan in sod., 2013).

Metoda temelji na aktivnosti encima oz. njihovi kombinaciji, s katero katalizirajo nastajanje zelene aminokislina. Pri tem se prekursor določene aminokislina lahko s pomočjo encima pretvori v zeleno aminokislino (D'Este in sod., 2018). Uporabljajo se različni encimi, med katere sodijo hidrolitični encimi, amonijeve liaze, ter od NAD⁺ odvisne L- aminokislinske dehidrogenaze (Pollegioni, Servi, 2012). Encime najpogosteje pridobimo iz mikroorganizmov, kot npr. *Escherichia glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas dacunhae* in *Cryptococcus luredii* (D'Este in sod., 2018).

Metode se uporabljajo predvsem za proizvodnjo aminokislin, kot so alanin, metionin, valin, fenilalanin, triptofan, asparaginska kislina ter jabolčna in fenil mlečna kislina (Ramakrishnan in sod., 2013).

Prednosti encimskih metod so:

- kontinuiran postopek za proizvodnjo aminokislin,
- višja produktivnost in izboljšana hitrost reakcije,
- uporaba več encimskih sistemov in večfaznih reaktorjev.

Slabosti encimskih metod so:

- encimi ne prenesejo visokih temperatur,
- pomanjkanje operativne stabilnosti,
- specifičnost encimov,
- encimske zastrupitve,
- deaktivacije encimov,
- iztekanje encimov v imobiliziranih sistemih (Ramakrishnan in sod., 2013).

Encimska pretvorba je koristna v primeru, ko lahko aminokislino pridobimo z visoko specifičnimi encimi iz cenovno ugodnih surovin v kontinuiranem delovnem procesu. Acilaza katalizira stereospecifično hidrolizo N-acetil-DL-aminokislin, kar se v industriji uporablja za proizvodnjo L-alanina, L-valina, L-metionina, L-fenilalanina in L-triptofana. Encimska ločljivost je lahko konkurenčna le, če je povezana z učinkovitim encimskim sistemom za recikliranje ali imobilizacijo in enostavno racemizacijo nezaželenih acetilnih D-aminokislin (Leuchtenberger in sod., 1984).

3.3.2 Fermentacija s pomočjo mikroorganizmov

Danes se za proizvodnjo večine aminokislin uporablja metoda fermentacije. Uporaba fermentacije se je začela v poznih šestdesetih letih (Kusumoto, 2001). Za pridobivanje večine L-aminokislin se najpogosteje uporablja metoda fermentacije s pomočjo mikroorganizmov (Ikeda, 2002), s katero lahko z uporabo različnih mikroorganizmov pridobimo približno 10 aminokislin (Ramakrishnan in sod., 2013). Fermentacija je metoda za proizvodnjo aminokislin, pri kateri mikroorganizmi pretvorijo hranilne snovi v druge snovi, ki jih potrebujejo. Fermentacija se je pokazala kot učinkovita metoda leta 1957, ko so Kinoshita in sodelavci Kyowa Hakko Kogyo Co. v svoji študiji poročali o odkritju, da ima bakterija *Corynebacterium glutamicum* edinstveno zmožnost proizvodnje pomembnih količin L-glutamata neposredno iz poceni sladkorja in amonijaka. Fermentacijska metoda je omogočila drastično znižanje proizvodnih stroškov, saj so se prej uporabljale metode ekstrakcije iz proteinov in hidrolitov ali kemične sinteze. Proizvodnja in posledično cena aminokislin je tako dostopnejša, kar ji daje prednost pred ostalimi metodami na trgu. V nekaj letih po poročilu o proizvodnji L-glutamata s fermentacijo je družba tudi ugotovila, da mutant *Corynebacterium glutamicum* lahko proizvede veliko količino L-lizina, kar je omogočilo industrijsko proizvodnjo L-lizina s fermentacijo. Ti zaporedni dosežki so odprli nove poti za industrijo aminokislin pridobljenih z metodo fermentacije (Ikeda, 2003). Sprva so bile ostale aminokislino le stranski proizvodi pri fermentaciji L-glutaminske kisline. Z napredovanjem znanosti pa je naraščalo tudi zavedanje o njihovi pomembnosti v prehrani posameznika, kar je spodbudilo nadaljnji razvoj drugih metod pridobivanja (Nakamori, 2016).

Pri fermentaciji je pomembna predvsem izbira vrste mikroorganizma, za katerega je pomembno, da ima visok potencial za proizvodnjo aminokislin. Pomembni so tudi encimi, ki s svojim delovanjem določajo in regulirajo količino nastalih aminokislin. Z metodo fermentacije pridobivamo tudi dve najpogostejši aminokislini na trgu - glutaminsko kislino in lizin. Z napredkom tehnologije fermentacije in z izboljšanjem kvalitete seva se fermentacija uporablja v industrijski proizvodnji aminokislin (Ramakrishnan in sod., 2013). Začetne kulture mikroorganizmov so proizvedle do 10 g glutaminske kisline na liter. S stalnimi izboljšavami lahko danes mikroorganizmi proizvedejo čez 100 g glutaminske kisline na liter. Metoda fermentacije tako postaja ena bolj obetavnih metod pridobivanja aminokislin v tržne

namene. To omogočajo izboljšave na področju orodij genskega inženiringa, ki omogočajo večji izkoristek, specifičnost in produktivnost ciljnih sestavin (Ikeda, 2003).

Glavna pomanjkljivost mikrobne fermentacije je odvisnost celotne fermentacijske industrije od glukoze ali saharoze kot virov ogljika. Izvedljiva in stroškovno učinkovita alternativa je uporaba alkoholov (etanol in metanol) namesto sladkorjev (glukoze in saharoze) kot substrata za proizvodnjo aminokislin z uporabo bakterij, vendar ta pristop še ni izveden v velikem obsegu (Ramakrishnan in sod., 2013).

Fermentacijski procesi obsegajo predvsem tri korake:

- gojenje sevov, ki proizvajajo aminokislino,
- čiščenje aminokislin iz fermentacijske brozge in
- čiščenje odpadne vode.

Za učinkovito proizvodnjo je treba v vsakem koraku proizvodnje zagotoviti številne zahteve. Do sedaj so bile razvite številne tehnologije za vzpostavitev ekonomsko konkurenčnih fermentacijskih procesov. Predvsem je bil v zadnjih dveh desetletjih dosežen pomemben napredek pri razvoju tehnologije sevov. Vzreja sevov za proizvodnjo aminokislin je dosegla stanje zelo visokega razvoja, ki je bil glavni dejavnik, ki je privedel do velikega uspeha fermentacijske industrije. Napredek na področju rekombinante DNA so v tehnologiji omogočile razjasnitev molekularnih mehanizmov proizvodnje aminokislin in tudi molekularno biologijo in fiziologijo mikroorganizmov, ki proizvajajo aminokislino. Pridobljene temeljne informacije so bile osnova za naslednji genski inženiring z racionalnim pristopom, ki je privedel do ustvarjanja hiperproduktov in novih vrst proizvajalcev aminokislin z različnimi proizvodnimi mehanizmi (Ikeda, 2002). Pomemben del procesa je tudi čiščenje. Končno čiščenje namreč zagotavlja ustrezno kakovost za predvideno uporabo izolirane aminokislino. Končni produkt pridobimo v obliki kristaliničnega prahu (Kusumoto in sod., 2001).

3.4 IZOLACIJA S SUBLIMACIJO

Aminokislino iz naravnih vzorcev lahko izoliramo tudi s pomočjo sublimacije. Standardni postopek za izolacijo aminokislin iz naravnih vzorcev vključuje kislinsko hidrolizo kot tudi razsoljevanje vzorca pred analizo. Oba postopka zahtevata tekoče reagente in s tem pride do večje možnosti za kontaminacijo vzorca z laboratorijskimi onesnaževalci. Sublimacija sama po sebi ne zahteva mokrih kemičnih reagentov in odpravlja potrebo po kationski izmenjevalni kromatografiji, ki je pomemben vir kontaminacije vzorca. Razvil se je postopek

izolacije s pomočjo sublimacijskega aparata, kjer se sublimacija združi s hitrim in čistim postopkom hidrolize kislih hlapov, ob tem se iz naravnih vzorcev, kot so školjke mehkužcev in karbonatne globokomorske usedline, lahko izolirajo aminokislino. Ta postopek zagotavlja učinkovit način za izolacijo aminokislino iz naravnih vzorcev z minimalno mokro kemično obdelavo (Glavin in sod., 1998).

3.5 PRIMERJAVA POSTOPKOV PRIDOBIVANJA

Tabela 3 prikazuje prednosti in pomanjkljivosti različnih metod pridobivanja aminokislino.

Tabela 3: Primerjava prednosti in pomanjkljivosti različnih metod pridobivanja aminokislino (povzeto po D'Este in sod., 2018).

METODA	PRINCIP	PREDNOSTI	POMANJKLJIVOSTI
<i>Ekstrakcija iz proteinskih hidrolizatov</i>	Ločevanje aminokislino od obstoječih proteinskih hidrolizatov na podlagi različnih lastnosti	<ul style="list-style-type: none"> • obsežna industrijska proizvodnja (Ikeda, 2003) • možna uporaba industrijskih stranskih proizvodov ali odpadkov (Breuer in sod., 2004) • običajni reagenti (HCl, NaOH) (Lütke-Eversloh in sod., 2007) 	<ul style="list-style-type: none"> • malo vrst aminokislino (Ikeda, 2003) • odvisnost od razpoložljivosti naravnih virov, bogatih s proteini (Breuer in sod., 2004) • možen razpad proteinov (Ikeda, 2003) • stranski produkti (Beeuer in sod., 2004) • nastanek velikih količin odpadnih voda (Lütke-Eversloh in sod., 2007; Sereewatthanawut in sod., 2008)
<i>Kemijska sinteza</i>	Aminokislino pridobljene s kemijsko reakcijo	<ul style="list-style-type: none"> • pridobivanje akiralnih aminokislino (Ivanov in sod., 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> • pridobivanje racemnih zmesi - za pridobivanje L-aminokislino je potrebna dodatna optična resolucija (Ikeda, 2003) • cena katalizatorja (Breuer in sod., 2004) • nevarni viri (Zuend in sod., 2009)
<i>Encimska pretvorba</i>	Hidroliza peptidov s proteazami	<ul style="list-style-type: none"> • pridobivanje optično čistih D- in L-aminokislino (Ikeda, 2003) • majhna količina stranskih proizvodov (Ivanov in sod., 2014) • enostavna nadaljnja predelava (Ivanov in sod., 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> • cena in nestabilnost encima (Ikeda, 2003) • neugodna za proizvodnjo L-aminokislino na industrijski ravni (Ikeda, 2003)

METODA	PRINCIP	PREDNOSTI	POMANJKLJIVOSTI
<i>Fermentacija</i>	Mikroorganizmi pretvorijo v substratu prisotne sladkorje v aminokislino	<ul style="list-style-type: none"> • obsežna industrijska proizvodnja večine L-aminokislin (Ivanov in sod., 2014) • ekonomična metoda (Ikeda, 2003) • pridobivanje L-oblike aminokislin (Breuer in sod., 2004) • blagi pogoji (Ugimoto, 2010) • nizki stroški vzdrževanja (Ugimoto, 2010) 	<ul style="list-style-type: none"> • nujno zagotavljanje sterilnosti (Ugimoto, 2010) • potrebna energija za prenos kisika in mešanje (Ugimoto, 2010) • visoki stroški delovanja (Ivanov in sod., 2014)

Danes se vzporedno uporabljajo vse štiri metode, saj se proizvodnja posameznih aminokislin močno razlikuje. Prevladuje metoda fermentacije, ki predstavlja od 80 do 90 % celotne proizvodnje.

Industrijski procesi proizvodnje aminokislin kljub stalnim izboljšavam težijo k optimizaciji. Posledično se veliko število podjetij in akademskih ustanov posveča raziskavam na tem področju z namenom odkrivanja finančno učinkovitejših in bolj trajnostnih načinov pridobivanja aminokislin (D'Este in sod., 2018).

4 POSTOPKI PRIDOBIVANJA ZA POSAMEZNE AMINOKISLINE

4.1 L- ALANIN

D- in L- alanin pridobivamo s kemično sintezo iz aldehydov, amonijaka in cianida.

Alanin, pridobljen z mikrobiološkimi metodami iz glukoze, je zmes oblik D- in L-, pri čemer je 50% zmesi L- oblike alanina in 50% zmesi D- oblike alanina. Za pridobivanje se uporabljajo predvsem sevi *Arthrobacter oxydans*.

Alanin najpogosteje pridobivamo z encimsko sintezo iz asparaginske kisline ali iz fumarata, substrata asparaginske kisline (Nakamori, 2016).

4.2 L- ARGININ

Arginin lahko pridobivamo iz hidrolizatov proteinov, z encimsko sintezo ali z metodo fermentacije (Ogrinsky, 1957).

L- arginin je bil prvič izoliran leta 1886 iz izvlečka semen volčjega boba (rod *Lupinus*). Leta 1895 je bil identificiran kot sestavina kazeina, kasneje pa se je njegova uporaba razširila v prehrani in krmi (Utagawa, 2004). Večina L- arginina se pridobiva z metodo neposredne fermentacije iz naravnih virov ogljika (Yoshida, 1986). Začetki raziskav, povezanih s pridobivanjem arginina z metodo fermentacije, segajo v leto 1960. Pri fermentaciji se uporabljajo predvsem mutirane bakterije *Corynebacterium (Brevibacterium)*, *Bacillus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Bacillus subtilis* in *Serratia*. Novejše metode pridobivanja L- arginina vključujejo tehnike genske rekombinacije z bakterijo *Escherichia coli* in *Serratia marcescens* (Nakamori, 2016).

Za učinkovito pridobivanje arginina s fermentacijo je potrebno gojenje sevov z veliko sposobnostjo biosinteze L- arginina. Prav tako so potrebni sevi za pridobivanje L- glutaminske kisline, ki je prekursor L- arginina. Za pridobivanje L- glutaminske kisline se najpogosteje uporablja bakterija *Corynebacterium (Brevibacterium)*. Med procesom fermentacije morajo biti pogoji tako kot pri ostalih aminokislinah natančno uravnavani. Potrebno je uravnavanje pH okrog nevtralne vrednosti ter zagotavljanje stalnega dotoka kisika, ki je potreben za ustrezno nastajanje L- arginina. Sledijo metode čiščenja, ki so nujne za pridobivanje L- arginina visoke čistoče iz fermentacijske zmesi. Po končani fermentaciji bakterijske celice in preostale proteine odstranimo s centrifugiranjem ali z membrano, preostale nečistoče pa s smolo ionskega izmenjevalca ali aktivnim ogljem. Na koncu procesa z metodo koncentriranja pridobimo kristale L- arginina visoke čistoče (Utagawa, 2004).

4.3 L- ASPARAGINSKA KISLINA

L- asparaginska kislina je poleg fenilalanina glavna sestavina nizko energijskega sladila aspartama, uporablja pa se še v medicini, zato je njena uporaba zelo razširjena. L- asparaginska kislina je prva aminokislina, ki je bila pridobljena z encimsko sintezo. Pridobivajo jo še s sevi *Escherichia coli* in *Brevibacterium flavum* (Nakamori, 2016).

4.4 L- CISTEIN

L- cistein običajno pridobivamo iz keratina, skladiščenega v človeških in živalskih materialih, kot so perje, lasje, ščetine, dlake in kopita (D'Este in sod., 2018). Proizvodnja zajema predvsem ekstrakcijo iz kislih hidrolizatov, pogosta pa je še encimska pretvorba kemijsko sintetiziranega intermedata v L- cistein. Industrijsko lahko cistein pridobivamo tudi s fermentacijo (Nakamori, 2016).

4.5 L- FENILALANIN

Potreba po pridobivanju L- fenilalanina je visoka predvsem zaradi dejstva, da je ena izmed sestavin aspartama, nizko energijskega sladila. Glavna encima za pridobivanje L- fenilalanina sta predvsem 3-deoksi-D-arabinoheptulosonat-7-fosfat (DAHP) sintaza ter kompleks korizmat mutaze in pefenat dehidrataze. Pri metodi fermentacije je najbolj pogost organizem *Escherichia coli*, ki omogoča največji donos, uporablja pa se lahko še *Bacillus lactofermentum* (Nakamori, 2016).

4.6 L- HISTIDIN

Histidin najpogosteje izoliramo iz kislega produkta hidrolize proteinov. Po odstranitvi kisline lahko histidin iz raztopine izoliramo z različnimi postopki. Pogosta metoda izolacije histidina vključuje obarjanje z živosrebrovim sulfatom v razredčeni žveplovi kislini (Tabor, 1957). Pri metodi fermentacije izkoriščajo predvsem seve *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* in *Serratia marcescens* (Nakamori, 2016).

Čistost izoliranega histidina lahko najboljše določimo z metodo optične rotacije, elementarnimi analizami in papirno kromatografijo (Tabor, 1957).

4.7 L- GLUTAMIN

L- glutamin se v industrijski proizvodnji pridobiva tekom procesa fermentacije. Uporablja pa se predvsem v farmacevtske namene. Za proizvodnjo glutamina visoke kakovosti po nizki ceni je najbolj pomembno, da se pridobi sev mikroorganizma z dobro učinkovitostjo in

minimalnimi stranskimi produkti. Zelo pomemben korak v procesu pa je odstranitev nečistoč iz fermentirane brozge, ravno zato se tekom celega industrijskega postopka upoštevajo kemijske, fizikalne in biološke lastnosti brozge.

Sevi, ki proizvajajo L- glutamin, so šibki in ogroženi v kontaminiranem okolju, zato je zelo pomembno, da je posoda za fermentacijo čista in sterilna tekom celotnega procesa. Pomembno je tudi, da je posoda pod pozitivnim pritiskom, saj se tako onemogoči kontaminacija z drugimi mikroorganizmi in zunanjim materialom. Fermentacijski medij je sestavljen iz glukoze kot vira ogljika, amonijaka kot vira dušika in iz majhne količine mineralov in vitaminov kot ravnih dejavnikov. Kot kontrolni dejavniki med fermentacijo so pomembni pH, temperatura in raztopljen kisik (Kusumoto, 2001).

Bakterija, ki proizvaja L- glutamin, je izpeljana iz seva, ki proizvaja L- glutaminsko kislino in je sposobna proizvodnje L- glutamina visoke kakovosti z minimalno tvorbo stranskih produktov (Kusumoto, 2001). Bakterija, ki proizvaja glutaminsko kislino je *Corynebacterium glutamicum*. (Nakamori, 2016).

4.8 L- GLUTAMINSKA KISLINA

Glutaminsko kislino pridobivamo predvsem na dva načina: s kemično sintezo in fermentacijo. Metoda kemične sinteze je starejša in temelji na pridobivanju glutaminske kisline iz akrilonitrila, ogljikovega monoksida in vodikovega cianida. Slabost te metode je predvsem dolg in drag proces izolacije L-glutaminske kisline iz racemne zmesi. Zaradi nižjih stroškov proizvodnje se je bolj razširila metoda fermentacije z bakterijo *Corynebacterium glutamicum*. Danes lahko L- glutaminsko kislino pridobivamo še z drugimi mikroorganizmi, kot so npr. *Brevibacterium* in *Microbacterium*. Od odkritja metode fermentacije L- glutaminske kisline se je proizvodnja vsako leto povečevala, leta 2010 so proizvedli 2,4 milijona ton mononatrijevega glutamata (Nakamori, 2016).

4.9 L- LIZIN

Leta 1958 je podjetje Kyowa Hakko Kogyo razvilo metodo fermentacije lizina z uporabo bakterije *Corynebacterium glutamicum*. Ugotovilo je namreč, da homoserin avksotrofni mutant *Corynebacterium glutamicum* proizvaja velike količine lizina v tekočem mediju (Nakayama in sod., 1961). Ta proces izolacije predstavlja drugi najstarejši proces fermentacije aminokislin (najstarejši proces je fermentacija glutamata). Danes se proizvede več kot 2 milijona ton lizina na leto in se tako uvršča na drugo mesto glede na svetovno letno proizvodnjo aminokislin (Ikeda, 2016). Trenutno je svetovni trg lizina ocenjen na 2,2 milijona ton na leto, proizvodnja pa vsako leto zraste za 7 % (Eggeling in sod., 2015). L-lizin ima

namreč pomembno tržno vrednost, saj se uporablja kot krmni dodatek za pospeševanje rasti živali, predvsem prašičev in perutnine. Uporablja se pa tudi kot krmni dodatek za ribe. Lizin lahko tudi izoliramo iz naravnih virov kot so soja in sardine, vendar se v veliki meri uporablja metoda fermentacije, saj le takrat dobimo lizin v L- obliki, ki je nujno potrebna za krmne dodatke (Ikeda, 2016). Za proizvodnjo L- lizina pa se uporablja tudi metoda fermentacije z genetsko spremenjeno bakterijo *Escherichia coli* (Nakamori, 2016). Lizinske fermentacije z uporabo *Escherichia coli* so skoraj dosegle raven, ki je primerljiva metodam fermentacije s sevi *Corynebacterium glutamicum*. *Escherichia coli* je ekonomsko lahko bolj koristna in dostopna, saj kaže hitrejšo rast pri višjih temperaturah kot *Corynebacterium glutamicum* (Ikeda, 2016).

4.10 L- METIONIN

Metionin je druga najbolj prodajana aminokislina na trgu, je esencialna aminokislina, ki tako kot cistein vsebuje žveplo. Uporablja se v različnih industrijskih aplikacijah, predvsem pri proizvodnji krme. Uporablja pa se še v proizvodnji živilskih dodatkov ter v farmaciji. Je pomemben krmni dodatek zlasti za perutnino, saj pri njih predstavlja prvo omejujočo aminokislino. D,L- metionin se proizvaja s kemično sintezo ob uporabi akroleina, metantiola, vodikovega cianida in drugih spojin. V zadnjih nekaj desetletjih si prizadevajo za proizvodnjo L- metionina z mikrobno fermentacijo. Raziskovalci so se osredotočili na razvoj ustreznih sevov s klasično mutagenozo. Na *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* tako izvajajo obsežen metaboni inženiring, ampak kljub obsežnim raziskavam še vedno obstaja veliko vrzeli med našim razumevanjem mikroorganizmov in množično proizvodnjo aminokislin (Shim in sod., 2006).

4.11 L- PROLIN

Industrijska proizvodnja prolina izhaja iz *Brevibacterium flavum*, pogosta pa je še uporaba *Serratia marcescens* (Nakamori, 2016).

4.12 L- SERIN

L-serin proizvajajo s fermentacijsko pretvorbo glicina s pomočjo *Corynebacterium glycinophilum* (Nakamori, 2016). Uporabljajo se lahko še druge bakterije, kot so *Nocardia*, *Sarcina*, *Pseudomonas* in *Hyphomicrobium sp* (Morinaga, Yamada, 1986). Pogosto je predvsem pridobivanje L- serina iz glukoze brez dodajanja glicina s sevom *Brevibacterium flavum* (Hibino in sod., 2000).

4.13 L- TREONIN

Treonin uporabljamo v medicini in kot prehransko dopolnilo. Za gojenje sevov se uporabljajo gensko spremenjeni ter na aminohidropentanojsko kislino (AHV) odporni *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Serratia marcescens*, *Bacillus lactofermentum* in *Escherichia coli*, pri čimer je najbolj pogosto pridobivanje z *Escherichia coli*, saj omogoča največji izkoristek (Nakamori, 2016). Pridobivanje L- treonina se je najbolj izboljšalo z amplifikacijo biosintetskih encimov preko napredka rekombinantnih DNK tehnik bakterije *Escherichia coli* (Debabov, 1983).

4.14 L- TRIPTOFAN

Triptofan so najprej pridobivali z metodo encimske pretvorbe iz prekurzorjev, kot so indol, piruvat in amonijak. Sledilo je pridobivanje z metodo fermentacije, saj je omejitev metode encimske sinteze predvsem previsoka cena prekurzorjev. Danes je najbolj pogosto pridobivanje s pomočjo sevov *Escherichia coli* (Nakamori, 2016).

Triptofan lahko izoliramo tudi iz kislega produkta hidrolize proteinov. Po odstranitvi kisline lahko triptofan iz raztopine izoliramo z različnimi postopki. Pogosta metoda izolacije triptofana vključuje obarjanje z živosrebrovim sulfatom v razredčeni žveplovi kislini (Tabor, 1957).

4.15 BCAA

BCAA je kratica iz angleške besedne zveze Branched Chained Amino Acids, ki pomeni razvejane aminokislino. Razvejane aminokislino so L- izolevcin, L- levcin in L- valin. To so esencialne aminokislino, ki jih višji organizmi ne morejo sintetizirati, zato jih moramo zaužiti s hrano oziroma krmo. Razvejane aminokislino so tudi cenjene kot sintetični intermediati za zdravila, zato je povpraševanje po BCAA v farmacevtski industriji vedno večje. Uporabljajo pa se tudi v prehranskih proizvodih, kozmetiki, služijo pa tudi kot prekurzorji antibiotikov in herbicidov (Yamamoto in sod., 2016). BCAA se v industriji proizvaja s fermentacijo ob pomoči mutiranih in metabolično spremenjenih mikroorganizmov, ki izvirajo iz *Corynebacterium glutamicum* ali *Escherichia coli* (Wendisch in sod., 2006). V preteklosti so BCAA proizvajali s kemično sintezo, njihove enantiomere so nato encimatsko ločili s kemijsko derivatizacijo ali s kromatografsko ločitvijo. Ker se je pa povpraševanje po BCAA povečalo, so fermentacijske metode vzbujale vedno večje zanimanje, predvsem zaradi gospodarskih razlogov in okoljskih vplivov (Park in sod., 2008).

Tabela 4: Primerjava esencialnosti in pridobivanja posameznih aminokislin (povzeto po Ault, 2004).

Aminokislina	Esencialnost	Izolacija z ekstrakcijo iz naravnih virov	Pridobivanje s kemijsko sintezo	Pridobivanje s fermentacijo	Pridobivanje z encimsko sintezo
D- Alanin	-	-	-	-	✓
D, L- Alanin	-	-	✓	-	-
D- Arginin	ljudje jih nekaj lahko sintetiziramo, ko pa smo pod stresom ali hitro rastemo, pa jih ne sintetiziramo dovolj	✓	-	✓	-
D- Asparginska kislina	-	-	-	-	✓
D- Aspargin	-	✓	-	-	-
L- Cistein	nujne za otroke	✓	-	-	✓
Cistin	-	✓	-	-	✓
Glicin	-	-	✓	-	-
D- glutaminska kislina	-	-	-	✓	-
D- Glutamin	-	-	-	✓	-
D- Histidin	ljudje jih nekaj lahko sintetiziramo, ko pa smo pod stresom ali hitro rastemo, pa jih ne sintetiziramo dovolj	-	-	✓	-
D- Izolevcin	✓	-	-	✓	-
D- Levcin	✓	✓	-	✓	-
D- Lizin	✓	-	-	✓	-
D- Metionin	✓	-	-	-	✓
D,L – Metionin	-	-	✓	-	-
D- Fenilalanin	✓	-	✓	✓	✓
D- Prolin	-	-	-	✓	-
D- Serin	-	-	-	✓	✓

Aminokislina	Esencialnost	Izolacija z ekstrakcijo iz naravnih virov	Pridobivanje s kemijsko sintezo	Pridobivanje s fermentacijo	Pridobivanje z encimsko sintezo
D- Tretionin	✓	-	✓	✓	-
D- Triptofan	✓	-	✓	✓	✓
D- Tirozin	nujne za otroke	✓	-	✓	-
D- Valin	✓	-	✓	✓	-

5 ANALIZNE METODE ZA UGOTAVLJANJE NEČISTOČ V PROIZVODNJI AMINOKISLIN

Profil nečistoč posameznih aminokislin je v največji meri odvisen od proizvodnega procesa s katerim pridobivamo aminokislino. Zaradi raznolikosti proizvodnih metod (fermentacija, hidroliza proteinov in kemična sinteza), nastaja potreba po razvoju univerzalnih metod, s katerimi bi lahko določili profil nečistoč pri aminokislinah ne glede na metodo njihovega pridobivanja. S tem bi lahko različne metode in njihov učinek tudi neposredno primerjali med sabo. Pogosta metoda določevanja nečistoč aminokislin je tankoplastna kromatografija, vse več pa je specifičnih metod za posamezne aminokislino, ki pa ne zaznajo do sedaj še neznanih sorodnih snovi in razpadnih produktov (Wahl in Holzgrabe, 2016).

Kakovost in varnost aminokislin lahko preverjamo z ustreznimi analitskimi metodami. Zahtevnejši del pri določanju stopnje čistosti je največkrat ločevanje in določitev sorodnih snovi in razpadnih produktov. Ker so aminokislino večinoma hidrofilne in ne vsebujejo kromoforja (del molekule barvila s šibko vezanimi elektroni, ki selektivno absorbirajo svetlobo v vidnem delu spektra in tako določajo obarvanost), sta ločevanje in določitev s HPLC⁴ sistemom otežena (Wahl in Holzgrabe, 2016). Nečistote, prisotne v posamezni aminokislini, so odvisne tudi od izvora aminokislino (rekombinantna, sintetična) in od možnih vmesnih reakcij. Pogosto so sorodne snovi ene izmed aminokislin lahko druge aminokislino, razkrojene aminokislino in prekursorji, kar predstavlja enake izzive pri določitvi in ločevanju aminokislin (MacFadyen, 1950).

V nadaljevanju so predstavljene potencialne nečistote med pridobivanjem aminokislin glede na proizvodno metodo:

- KEMIČNA SINTEZA

Možne nečistote, ki se pojavijo tekom procesa kemične sinteze so predvsem nečistote iz začetnih surovin, stranskih produktov in intermediatov (L- alanin, L- cistein, glicin, L- lizin, DL- metionin) (Wahl in Holzgrabe, 2016).

- FERMENTACIJA

Možne nečistote, ki se pojavijo tekom procesa fermentacije so predvsem različne sestavine fermentacijske brozge (L- alanin, L- arginin, L- cistein, L- glutaminska kislina, L- histidin, L- levcin, L- lizin, L- metionin, DL- metionin, L- fenilalanin, L- serin, L- treonin, L- triptofan, L- tirozin, L- valin), stranski produkti biosinteze (L- alanin, L- arginin, L- cistein, L- glutaminska kislina, L- histidin, L- levcin, L- lizin, L- metionin, DL- metionin, L- fenilalanin, L- serin, L-

⁴ HPLC je okrajšava iz angleške besedne zveze High Performance Liquid Chromatography, ki pomeni tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.

treonin, L- triptofan, L- tirozin, L- valin), nečistote iz začetnih surovin (L- metionin, L- fenilalanin, L- triptofan) in intermediatov (L- metionin, L- fenilalanin, L- triptofan), možne nečistote pa so tudi druge aminokisljne (L- asparagin) (Wahl, Holzgrabe, 2016).

- **HIDROLIZA PEPTIDOV**

Možne nečistoče, ki se pojavijo tekom procesa hidrolize proteinov so predvsem druge aminokisljne (L- arginin, L- cistein, L- histidin, L- levcin, L- fenilalanin, L- tirozin) in ostanki sestavin mešanic (L-tirozin) (Wahl, Holzgrabe, 2016).

5.1 METODE ZA DOLOČANJE NEČISTOČ AMINOKISLIN

Predstavljene so najpogostejše metode za določitev posameznih nečistot, ki so v evropski farmakopeji⁵, torej so primerne za kontrolo kakovosti, niso pa vključene metode, ki se uporabljajo sicer uporabljajo le v razvojne namene prehranske industrije.

5.1.1 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje zmesi in mešanic in je v kombinaciji z drugimi testi (detekcija z ninhidrinom) primerna metoda za identifikacijo posameznih nečistot. Pomanjkljivost metode za določanje nečistot je predvsem nezadostna občutljivost, zato je potreben razvoj bolj občutljivih in specifičnih tehnik (Wahl in Holzgrabe, 2016).

5.1.2 Analiza aminokislin

Analiza aminokislin se uporablja za določitev aminokislinske sestave in vsebine proteinov, peptidov in drugih farmacevtskih pripravkov. Prednost te metode je višja občutljivost kot pri tankoplastni kromatografiji. Vključuje metode hidrolize proteinov (11 metod) in analize aminokislin (8 metod) (Wahl in Holzgrabe, 2016).

⁵ Farmakopeja je publikacija, ki vsebuje standardizirane predpise za razvoj, izdelavo in preskušanje kakovosti zdravil in njihovih sestavin ter druge podatke o zdravilih in njihovi uporabi. Zakonodaja določa obveznost uporabe standardov Evropske farmakopeje za države podpisnice posebne konvencije Sveta Evrope (EDQM Council of Europe, 2019).

5.1.3 UV spektroskopija

Večina aminokislin ne vsebuje kromofora (konjugirane dvojne vezi), kar onemogoči določitev z UV. Kljub temu lahko pri nizkih valovnih dolžinah (< 220 nm) zaznamo premik karboksilne kisline in s tem določimo aminokislino (Yokoyama in sod., 2005). Ena glavnih pomanjkljivosti UV metode je nizka občutljivost, kar omeji njeno uporabo. Povečamo jo lahko s sodobnejšimi detektorji (Wahl in Holzgrabe, 2016).

6 ZAKLJUČEK

V industrijski proizvodnji se proizvede največ D- glutaminske kisline, sledi proizvodnja D- lizina in L,D- metionina na drugem in tretjem mestu. D- glutaminska kislina se uporablja kot dopolnilo v prehrani ljudi, D- lizin in L,D- metionin pa kot dodatek h krmi domačim živalim (Ault, 2004).

Med enokomponentnimi izdelki je na slovenskem trgu najpogostejša aminokislina arginin, glutamin, karnitin⁶. Pri tem so seveda upoštevana prehranska dopolnila in ne izdelki, v katerih so aminokislina aditivi ali imajo neko drugo sekundarno vlogo.

Pri tem ni zanemarljiv podatek, da je v istem obdobju na trgu v P3 kategoriji *Aminokislina* 27 % enokomponentnih izdelkov in kar 65 % multikomponentnih⁷. O stabilnosti aminokislinskih mešanic pa še ne vemo veliko.

Vse aminokislina imajo okus, pri tem pa mora biti njihova koncentracija dokaj visoka, da jih lahko zaznamo. Glicin, D- alanin, D- serin in treonin imajo sladek okus, ostale D izomere razen glutaminske kisline pa imajo grenak okus. L izomere aminokislina imajo sladek okus. Glicin se tako dodaja saharinu, da bi prikrili njegov grenak priokus. Za potrošnika je pomembno, da ve, da je z nekim prehranskim dopolnilom ali drugim živilom zaužil izolirano aminokislino in s kakšnim namenom je dodana izdelku. Prav tako je pomembna navedba metoda pridobivanja, saj se med seboj vedno bolj razlikujemo po vrednotah v prehrani. Nekateri so vegani, drugim je najpomembneje, da čim manj škodujejo okolju in so proti kemijski sintezi v prehranski industriji, spet tretjim je pomembno samo, da je osnovni namen dosežen, npr. dodajanje neke določene aminokislina. Označevanje metode pridobivanja aminokislina je na trgu prehranskih dopolnil vse bolj prisotno, je pa potrebno še standardizirati izrazoslovje in izboljšati kakovost prevodov, da bodo nedvoumni⁸. Prav tako nekateri navajajo beljakovinski vir za hidrolizo, pri čemer pa je prav tako poveden podatek o kvalitativni in kvantitativni sestavi nehidroliziranega dela, ki bi ga bilo zato smiselno dodati.

Podobno so tudi pri drugih metodah informacije lahko pomanjkljive, čeprav so navedene. Na primer, katera topila oziroma reagenti so uporabljeni v proizvodnji. Tako točno vemo, če

⁶ Podatke je za leto 2017 iz svoje letne analize maloprodajnih cen na trgu prehranskih dopolnil v Sloveniji posredoval Inštitut za raziskave in razvoj kakovosti v Ljubljani.

⁷ Podatek iz baze P3 Professional za leto 2017.

⁸ Informacija iz baze P3 Professional za leto 2019.

želimo preveriti kakovost teh izdelkov, da moramo preveriti tudi morebitne zaostanke uporabljenih kemijskih reakcij oziroma kemikalij.

Analitika aminokislin je zahtevna, zato ne preseneča poseganje po metodah, ki so uveljavljene v farmaciji torej za zdravila, npr. v obliki farmakopejskih predpisov. Ob tem se je potrebno zavedati, da gre za standarde, ki za živilsko industrijo niso obvezni, zato niso zavezujoči. Poleg tega pa je še vedno treba paziti na vzorčenje, opredelitev sprejemljivih meja rezultatov ter njihovo interpretacijo. Za parenteralno in enteralno prehrano so namreč, razumljivo, zahteve glede na način uporabe in ciljno skupino drugačne kot za prehranska dopolnila. In navsezadnje, pozitiven rezultat analize prav tako še ne pomeni zagotavljanja kakovosti, ki je povezano z opredelitvijo proizvodnih procesov v skladu s priznanimi mednarodnimi standardi.

7 VIRI IN LITERATURA

1. Anderluh G, Maček P, Sepčič K, Turk T (2009) Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana: Študentska založba: 51-81
2. Ang PA (2009) Food and Agricultural Import Regulations and Standards (FAIRS— Narrative, Philippines. USDA Foreign Agricultural Service.
3. Ault A (2004) The Monosodium Glutamate Story: The Commercial Production of MSG and Other Amino Acids. *J Chem Educ* 81 (3):347-355. doi: 10.1021/ed081p347
4. Boyer R. (2005) Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba: 70-76
5. Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßeler M, Stürmer R, Zelinski T (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* 43 (7):788–824. doi: 10.1002/anie.200300599
6. Cheng H, Zhu X, Zhu C, Qian J, Zhu N, Zhao L, Chen J (2008) Hydrolysis technology of biomass waste to produce amino acids in sub-critical water. *Bioresour Technol* 99:3337–3341. doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.024
7. D’Aniello A, Petrucelli L, Gardner C, Fisher G (1993) Improved Method for Hydrolyzing Proteins and Peptides Without Inducing Racemization and for Determining Their True D-Amino Acid Content. *Anal Biochem* 213 (2):290–295. doi:10.1006/abio.1993.1423
8. Dayhoff MO (1965) Atlas of protein sequence and structure. Silver spring: National Biomedical Research Foundation
9. Debabov VG (1983) Construction of strains producing L-threonine: 254–256
10. D'Este M, Alvarado-Morales M, Angelidaki I (2018) Amino acids production focusing on fermentation technologies - A review. *Biotechnol Adv* 36 (1):14-25. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.001
11. Direktiva 2002/46/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 10. junija 2002 o približevanju zakonodaj držav članic o prehranskih dopolnilih (2002) Uradni list Evropske unije 12.7.2002. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=SL>
12. EDQM Council of Europe (2019) Background & Mission. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-background-50.html>

13. Eggeling L, Bott M (2015) A giant market and a powerful metabolism: l-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(8):3387–3394. doi:10.1007/s00253-015-6508-2
14. European Food Safety Authority [EFSA] (2012) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal* 10(2):2557. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2557>
15. European Food Safety Authority [EFSA] (2014) Scientific Opinion on the safety and efficacy of the use of amino acids (chemical group 34) when used as flavourings for all animal species. *EFSA Journal* 12(5):3670. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3670>
16. Fountoulakis M, Lahm HW (1998) Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J Chromatogr A* 826 (2):109-134. doi:10.1016/s0021-9673(98)00721-3
17. Fruton JS (1947) The Isolation of Pure Amino Acids. *Yale J Biol Med* 19 (6):999-1012.
18. Glavin DP, Bada JL (1998) Isolation of amino acids from natural samples using sublimation. *Anal Chem* 70 (15):3119-3122. doi:10.1021/ac9803784
19. Hibino W, Ikkai T, Ito M, Gusyatiner MM, Burikov F (2000) Development of direct fermentation of L-serine from sugars. *Abst Ann Meet Japan Soc Biosci Biotechnol Agrochem*:247
20. Huang J, Nkrumah PN, Appiah-Sefah G, Tang S (2013) Authentication of Pure L-Leucine Products Manufactured in China by Discriminating between Plant and Animal Sources Using Nitrogen Stable Isotope Technique. *J Food Sci* 78 (3):490-494. doi: 10.1111/1750-3841.12041
21. Ikeda K (1908) A new flavor enhancer. *J Tokyo Chem Soc* 30:820–836
22. Ikeda M (2002) Amino acid production processes. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 79: 1-35. doi:10.1007/3-540-45989-8_1
23. Ikeda M (2003) Amino Acid Production Processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 79:1-35
24. Ikeda M (2016) Lysine Fermentation: History and Genome Breeding. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73–102. doi:10.1007/10_2016_27
25. Ivanov K, Stoimenova A, Obreshkova D, Saso L (2014) Biotechnology in the production of pharmaceutical industry ingredients: amino acids. *Biotechnol Biotechnol Equip* 27 (2):3620–3626. doi: 0.5504/BBEQ.2012.0134

26. Kusumoto I (2001) Industrial Production of L-Glutamine. *J Nutr* 131 (9):2552–2555. doi:10.1093/jn/131.9.2552s
27. Leuchtenberger W, Karrenbauer M, Plöcker U (1984) Scale-up of an Enzyme Membrane Reactor Process for the Manufacture of L-Enantiomeric Compounds. *Ann N Y Acad Sci* 434 (1):78–86. doi:10.1111/j.1749-6632.1984.tb29803.x
28. Lütke-Eversloh T, Santos CNS, Stephanopoulos G (2007) Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (4):751–762. doi: 10.1007/s00253-007-1243-y
29. MacFadyen DA (1950) On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α -amino acids. I. Absorption spectra of ninhydrin and certain derivatives. *J Biol Chem* 186:1–12
30. Morinaga Y, Yamada H (1986) Serine. *Biotechnology of amino acid production*. Kodansha/Elsevier. Tokyo/Amsterdam:217–223
31. Nakamori S (2016) Early History of the Breeding of Amino Acid-Producing Strains. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 159:35-53. doi:10.1007/10_2016_25
32. Nakayama K, Kitada S, Kinoshita S (1961) Studies on lysine fermentation 1. *J Gen Appl Microbiol* 7 (3):145–154. doi:10.2323/jgam.7.145
33. Ogrinsky EL (1957) Isolation and determination of arginine and citrulline. *Method Enzymol* 3:639-643
34. Park JH, Lee SY (2008) Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. *Curr Opin Biotechnol* 19 (5):454–460. doi:10.1016/j.copbio.2008.08.007
35. Pollegioni L, Servi S (2012) *Unnatural Amino Acids Methods and Protocols*. Humana Press
36. Pourali O, Asghari FS, Yoshida H (2009) Sub-critical water treatment of rice bran to produce valuable materials. *Food Chem* 115:1–7. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.099
37. Ramakrishnan V, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM (2013) Enzymatic extraction of amino acids from fish waste for possible use as a substrate for production of jadomycin. *Enzyme Eng* 2 (2):112. doi: 10.4172/2329-6674.1000112
38. Renneberg R (2008) High grade cysteine no longer has to be extracted from hair. *Demain. Biotechnology for Beginners*. Elsevier: 106

39. Richter M, Baerlocher K, Bauer J, Elmadfa I, Heseker H, Leschik-Bonnet E, Stangl G, Volkert D, Stehle P (2019) Revised Reference Values for the Intake of Protein. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 242-250. https://www.researchgate.net/publication/332265925_Revised_Reference_Values_for_the_Intake_of_Protein/citation/download
40. Sereewatthanawut I, Prapintip S, Watchiraruji K, Goto M, Sasaki M, Shotipruk A (2008) Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresour Technol* 99 (3):555–561. doi: 0.1016/j.biortech.2006.12.030
41. Shim J, Shin Y, Lee I, Kim SY (2016) L- Methionine Production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*:153-177. doi:10.1007/10_2016_30
42. Tabor H (1957) Isolation and Determination of Histidine and Related Compounds. *Method Enzymol* 3:623-635
43. Ugimoto MS (2010) Amino acids, production processes. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. John Wiley & Sons: 1–11
44. Uredba (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o aditivih za živila (2008) *Uradni list Evropske unije* 31.12.2008. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333&qid=1398328362975&from=SL>
45. Utagawa T (2004) Production of Arginine by Fermentation. *J Nutr* 134 (10):2854-2857. doi: 10.1093/jn/134.10.2854S
46. Vickery HB (1947) Rules for the nomenclature of the natural amino acids and related substances. *J Biol Chem* 169 (2):237-245
47. Wahl O, Holzgrabe U (2016) Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes. *Talanta* 154:150-163. doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.071
48. Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ (2006) Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol* 9 (3):268–274. doi: 10.1016/j.mib.2006.03.001
49. Yamamoto K, Tsuchisaka A, Yukawa H (2017) Branched-Chain Amino Acids. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 159:103-128. doi: 10.1007/10_2016_28

50. Yokoyama Y, Tsuji S, Sato H (2005) Simultaneous determination of creatinine, creatine, and UV-absorbing amino acids using dual-mode gradient low-capacity cation-exchange chromatography. *J Chromatogr*:110–116.
51. Yoshida H (1986) Amino acid fermentation. Gakkai Syuppan Center. Tokyo:243–247
52. Zhang J, Zhang S, Yang X, Qiu L, Gao B, Chen J (2016) Reactive extraction of amino acids mixture in hydrolysate from cottonseed meal with di (2-ethylhexyl) phosphoric acid. *J Chem Technol Biotechnol* 91:483–489. doi: 10.1002/jctb.4602
53. Zuend SJ, Coughlin MP, Lalonde MP, Jacobsen EN (2009) Scaleable catalytic asymmetric Strecker syntheses of unnatural alpha-amino acids. *Nature* 461 (7266):968–970. doi: 10.1038/nature08484