

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
**Бийский технологический институт (филиал)**  
федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего профессионального образования  
«Алтайский государственный технический университет  
им. И.И. Ползунова»

Е.В. Аверьянова, В.П. Севедин

**СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ  
КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ**

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ  
для студентов направлений подготовки 19.03.01 «Биотехнология»,  
19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья»  
и магистрантов направления подготовки  
19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья»

Бийск  
Издательство Алтайского государственного технического  
университета им. И.И. Ползунова  
2015

УДК 577.112.3(076)  
ББК 35.61  
А19

Рецензент: В.В. Елесина, к. б. н., доцент кафедры ОХЭТ

- Аверьянова, Е.В.**  
А19 Способы получения глутаминовой кислоты и ее производных: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ для студентов направлений подготовки 19.03.01 «Биотехнология», 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и магистрантов направления подготовки 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» / Е.В. Аверьянова, В.П. Севодин; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – 27 с.

В методических рекомендациях представлены обобщенные данные о свойствах, применении, гидролитических способах получения глутаминовой кислоты, описаны практические работы, охватывающие некоторые реакции глутаминовой кислоты.

УДК 577.112.3(076)  
ББК 35.61

Рассмотрены и одобрены  
на заседании кафедры  
«Биотехнология».  
Протокол № 5 от 30.01.2015 г.

© Аверьянова Е.В., Севодин В.П., 2015  
© БТИ АлтГТУ, 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	3
1 Строение и свойства глутаминовой кислоты .....	6
2 Способы получения <i>L</i> -глутаминовой кислоты .....	10
2.1 Выделение глутаминовой кислоты из белковых гидролизатов .....	12
3 Производные глутаминовой кислоты .....	17
3.1 <i>L</i> -Пирролидонкарбоновая кислота .....	17
3.2 <i>L</i> -Глутамин ( $\gamma$ -амид- <i>L</i> -глутаминовой кислоты) .....	18
3.3 Диэтиловый эфир <i>L</i> -глутаминовой кислоты гидрохлорид .....	22
3.4 $\gamma$ -Этил- <i>L</i> -глутамат .....	23
3.5 $\gamma$ -Метил- <i>L</i> -глутамат .....	23
3.6 Хлоргидрат дибензилового эфира <i>L</i> -глутаминовой .....	24
3.7 $\gamma$ -Бензил- <i>L</i> -глутамат .....	24
3.8 $\alpha$ -Бензил- <i>L</i> -глутамат .....	25
Литература.....	26

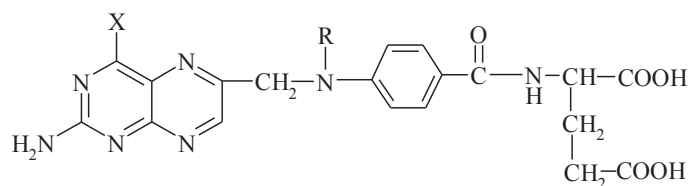
## ВВЕДЕНИЕ

Среди большого числа аминокислот, встречающихся в растительном и животном мире, глутаминовая кислота ( $\alpha$ -аминоглутаровая) занимает одно из важнейших мест.

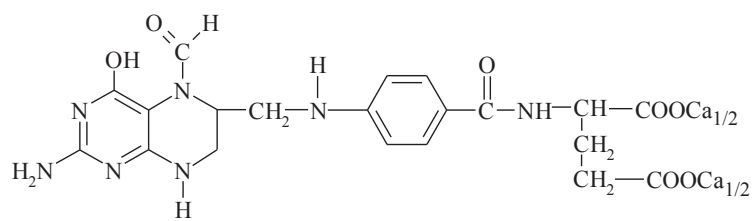
Глутаминовая кислота и ее амид глутамин широко распространены в природе, являются составными частями белков и внутриклеточного вещества растительных и животных организмов и играют активную роль в обмене веществ.

Впервые глутаминовая кислота была выделена из сернокислотного гидролизата пшеничной клейковины (глютена) в 1866 г. К.Г. Риттхаузенем, установившим ее эмпирическую формулу. Он же разработал пути ее промышленного получения. Позднее при изучении свойств водорослей Ламинария японский ученый К. Икеда установил наличие в них глутаминовой кислоты. Оказалось, что способность этих водорослей улучшать вкус пищи при добавке их в засушенном виде объясняется присутствием в них глутаминовой кислоты.

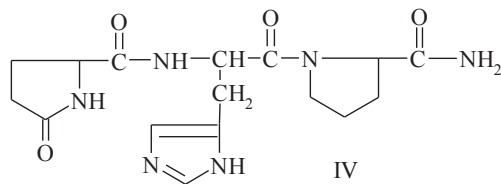
Глутаминовая кислота входит в состав многих белков и полипептидов и содержится в тканях животных и растений в свободном виде. Роль ее в организме очень велика, в частности, она является агентом, связывающим аммиак, образующийся в процессе обмена веществ. Глутаминовая кислота и ее кальциевая соль находят применение в качестве лекарственных средств, глутаминат натрия в значительных количествах используется в качестве усилителя вкуса мяса в консервной промышленности. Кроме того, глутаминовая кислота служит исходным веществом в производстве витаминов и антивитаминов группы фолиевой кислоты (I), метотрексата (II) и фолината кальция (III). Из глутаминовой кислоты получают также пироглутаминовую кислоту, используемую в синтезе рифатирина (IV). Иммуностимулирующий препарат тимоген (глутамил-триптофан) (V) является синтетически полученным дипептидом, состоящим из остатков аминокислот – глутамина и триптофана.



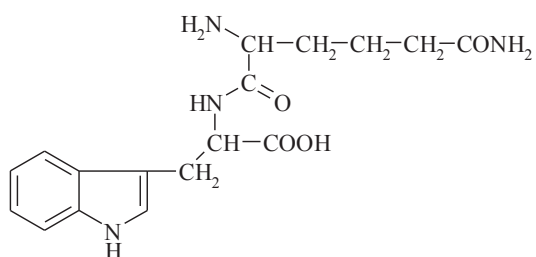
- I, X = OH, R = H;  
II, X = NH<sub>2</sub>, R = CH<sub>3</sub>



III



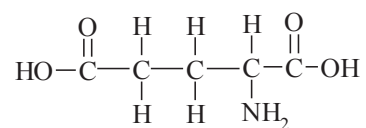
IV



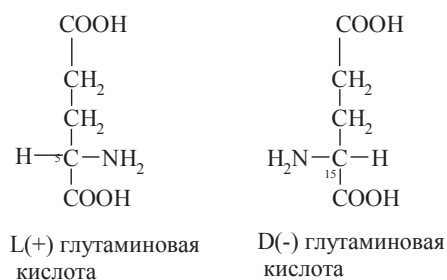
V

## 1 СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Глутаминовая кислота ( $\alpha$ -аминоглутаровая) относится к моноаминодикарбоновым кислотам и имеет следующую структурную формулу:



Она имеет асимметричный атом углерода ( $\alpha$ -углеродный атом), поэтому является оптически активным веществом и существует в виде двух энантиомеров:



Промышленное значение имеет L(+)-глутаминовая кислота. В водном растворе глутаминовая кислота имеет удельное вращение  $\alpha_D = +12,04^\circ$ . В щелочном растворе глутаминовая кислота имеет левое вращение. Добавление основного уксуснокислого свинца в небольших количествах понижает правое вращение, в больших – переводит правое вращение в сильно возрастающее левое.

Кроме L- и D-форм, может существовать оптически неактивная рацемическая смесь одинаковых количеств указанных оптических антиподов, которая обладает большей растворимостью в воде, чем чистая L-форма.

Биологическая активность оптических изомеров глутаминовой кислоты неодинакова, что выражается во вкусе моноватриевой соли и лечебном действии кислоты в L-форме. Этими свойствами D-глутаминовая кислота не обладает.

Молекулярный вес глутаминовой кислоты – 147,13; содержание азота – 9,51 %.

Химически чистая глутаминовая кислота  $C_5H_9O_4N$  представляет собой белый кристаллический порошок слабокислого вкуса, трудно растворимый в холодной воде и легче – при нагревании. Величина растворимости глутаминовой кислоты в 100 г воды при различной температуре представлена в таблице 1. Глутаминовая кислота плохо растворима в этиловом спирте; практически нерастворима в «ледяной» уксусной кислоте и в эфире.

Таблица 1 – Растворимость глутаминовой кислоты (в г) в 100 г воды

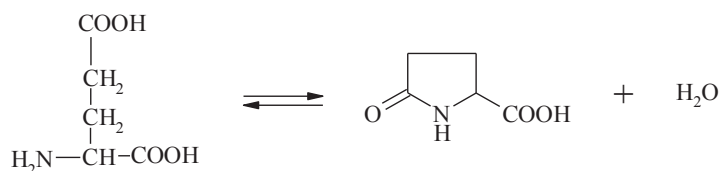
Кислота	Температура, °С				
	0	25	50	75	100
<i>L</i> -глутаминовая	0,341	0,843	2,186	5,532	14,00
<i>D, L</i> -глутаминовая	0,855	2,054	4,934	11,86	28,49
Гидрохлорид глутаминовой кислоты	33,0	38,0	43,0	63,0	81,0

Свободная кислота образует белые, чистые, сверкающие в результате отражения и преломления света кристаллы тетраэдрической и октаэдрической формы, а иногда – небольшие блестящие пластинки. Температура ее плавления 224–225 °С.

Карбоксильные и аминная группы глутаминовой кислоты, как и других аминокислот, обуславливают ее амфотерные свойства. Молекулы твердой кислоты обладают дипольной структурой, что определяет высокую прочность их кристаллов.

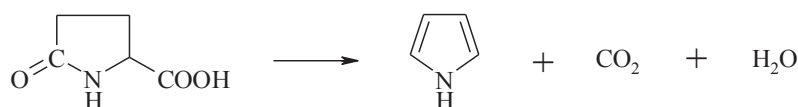
Постоянные диссоциации кислотных и основных групп аминокислот соответствуют постоянной диссоциации алифатических кислот и аминов. Изoeлектрическая точка для глутаминовой кислоты, то есть то значение pH, при котором не происходит перемещение ее молекул в электрическом поле, равна 3,2.

Глутаминовая кислота в растворах легко подвергается различным превращениям, скорость которых зависит от pH среды и температуры. При кипячении водных растворов глутаминовой кислоты происходит ее дегидратация с образованием *L*-пирролидонкарбоновой кислоты.



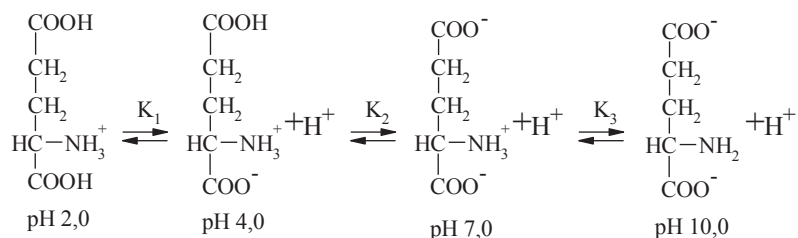
Скорость и направление этой обратимой реакции зависит от условий, в которых она протекает. Установлено, что в нейтральной зоне pH образование пирролидонкарбоновой кислоты происходит очень медленно. За 2–3 ч при pH 6,2 и температуре 100 °С циклизуется только до 1 % аминокислоты. Ускорение процесса происходит при термической обработке кислоты в слабокислых и слабощелочных растворах. При pH 3,0 и температуре 120 °С циклизация глутаминовой кислоты заканчивается за 3 ч; при pH 4,0 и температуре 100 °С – за 50 ч, при 120 °С – за 6 ч, при 160 °С – за 1,5 ч.

В сильнокислых или щелочных растворах пирролидонкарбоновая кислота превращается в глутаминовую кислоту быстро и полностью и в отличие от последней хорошо растворяется в воде. Из эквимолекулярных растворов обеих кислот ни одна не кристаллизуется. В процессе нагревания водных растворов *L*-глутаминовой кислоты при 180–220 °С образуется *D, L*-пирролидонкарбоновая кислота, которая при более высокой температуре превращается в пиррол.



Глутаминовая кислота в водных растворах на солнечном свете медленно разлагается, образуя пропионовый альдегид, аммиак и углекислый газ. В присутствии окиси алюминия, титана и цинка разложение происходит более интенсивно.

Глутаминовая кислота по своим свойствам является электролитом. Поэтому диссоциация ее водных растворов сильно зависит от pH среды. При разных значениях pH растворов глутаминовая кислота находится в разных ионных формах, из которых преобладающие играют основную роль в создании ионного равновесия:





Известно, что *L*-глутаминовая кислота как двухосновная образует кислые и средние соли. Первые легко растворимы в воде и имеют вкус мяса. В пищевой промышленности находит применение натриевая соль глутаминовой кислоты – мононатрийглутамат. Вкус мяса, свойственный водному раствору глутамата, обусловлен наличием в нем аниона глутаминовой кислоты, образующейся при диссоциации соли в воде.

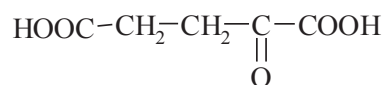
Интенсивность вкуса увеличивается с увеличением концентрации ионов глутаминовой кислоты и уменьшается в присутствии поваренной соли и уксусной кислоты. Это объясняется понижением содержания диссоциированных ионов глутаминовой кислоты в растворе.

## 2 СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

К настоящему времени разработаны различные способы получения глутаминовой кислоты, в том числе: химический – из отбросного щелока сепарационных цехов сахарных заводов, спиртовой барды; ионитный – из оттеков или мелассы; биохимический синтез – из мелассы или крахмала; из растительного или животного сырья и отходов их переработки, который можно условно назвать «гидролитическим»; химический синтез – из акрилонитрила и других реагентов.

*Синтетическую глутаминовую кислоту* получают из акролеина через β-альдегидомасляную кислоту, алкилированием бензоиламиномалонового эфира β-бромпропионовым эфиром с последующим омылением, путем цианирования β-цианпропионового альдегида в присутствии аммонийных солей с последующим гидролизом образующегося продукта цианирования щелочью и др. Но при этом конечный продукт получают постоянно в рацемической *DL*-форме, разделение которой на оптические антиподы затруднено. На рисунке 1 показана упрощенная схема синтетического процесса получения глутаминовой кислоты из акрилонитрила, включающая оптическое расщепление. Процесс расщепления смеси оптических изомеров глутаминовой кислоты включает растворение рацемической глутаминовой кислоты при определенной концентрации и кристаллизации попеременно *L*- и *D*-глутаминовой кислоты при внесении «затравки» соответствующего оптически активного изомера.

*Получение глутаминовой кислоты методом биосинтеза* основано на способности некоторых микроорганизмов синтезировать глутаминовую кислоту при брожении в углеводных средах. Весьма высокий выход глутаминовой кислоты получают при использовании для этой цели культур *Microccus* и *Variaus*. Промежуточным продуктом брожения является при этом α-кетоглутаровая кислота



которая затем превращается в глутаминовую путем восстановительного аминирования. Брожение ведется глубинным способом в углеводных – крахмалистых и глюкозных – средах при постоянном продувании среды воздухом при pH смеси от 6 до 9 и добавлении в питательную среду биотина.

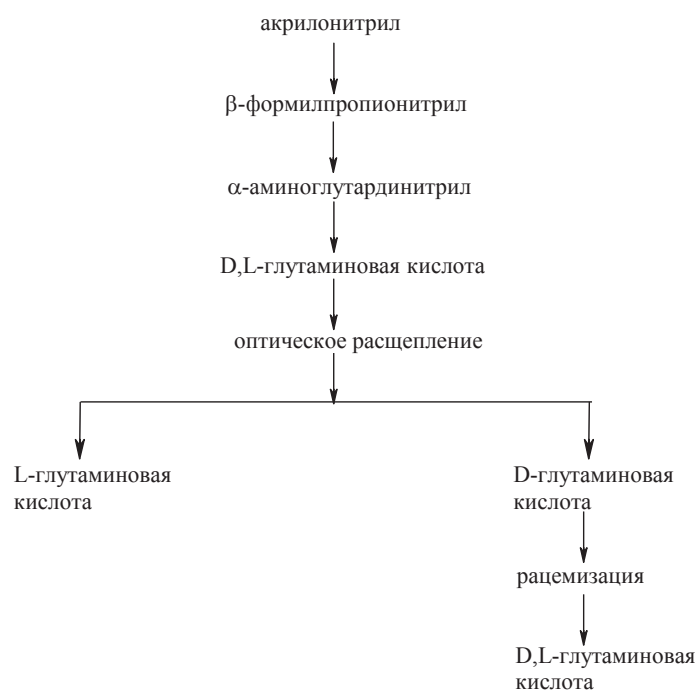


Рисунок 1 – Принципиальная схема производства глутаминовой кислоты синтетическим методом с использованием в качестве исходного материала акрилонитрила

*Из физико-химических методов* получения глутаминовой кислоты известен способ очистки соков и мелассы свеклосахарных заводов, а также сепарационных щелоков и спиртовой барды с помощью ионообменных смол, по которому вместе с другими несахарами смолы связывают и глутаминовую кислоту. При регенерации смол в результате ионного обмена в раствор переходит глутаминовая кислота, которую затем выделяют, очищают и используют для производства глутамата натрия.

*Под названием «гидролитических»* объединяются те методы получения глутаминовой кислоты, которые предусматривают применение кислотного или щелочного гидролиза исходного белкового или содержащего пироглутаминовую кислоту сырья и обычные методы выделения. При этом концентрированное сырье подвергается или кислотному, или щелочному гидролизу в течение 8–48 ч при температуре кипящей водяной бани.

## 2.1 Выделение глутаминовой кислоты из белковых гидролизатов

Глутаминовая кислота и ее полуамид глутамин широко распространены в природе; они входят в состав белков животного и растительного происхождения; глутамин, кроме того, находят в клеточном соке многих растений. Наглядное представление о распространении глутаминовой кислоты в растительных материалах дает таблица 2.

Сырьем для получения глутаминовой кислоты могут являться, следовательно, растительные и животные белки – казеин молока, клейковина пшеницы, глютен кукурузы, обезжиренная соевая мука, соевый шрот, отходы мясокомбинатов (рога, копыта) и тому подобные белковые материалы.

Как видно из данных таблицы 2, наиболее богатыми источниками глутаминовой кислоты являются клейковина пшеничной муки (глиадин и глютеин) и зеин, содержащийся наряду с другими белками и крахмалом в глютене кукурузы.

Таблица 2 – Содержание глутаминовой кислоты в животных и растительных белках

Наименование сырья	Содержание глутаминовой кислоты (или ее источника) в % от сухого веса белка
Глиадин пшеницы	42,2–45,7
Гордеин ячменя	38,4–44,3
Зеин кукурузы	26,9
Глютеин пшеницы	24,7–35,9
Кукурбитин тыквы	24,2
Казеин молока	22,0
Вицеллин гороха	21,3
Эдестин конопли	20,6
Рицин клещевины	19,0–20,2
Глицинин сои	19,5
Соевый шрот	8,5–9,1
Семена подсолнечника	8,7–9,4
Обезжиренная мука:	
из арбузных семян	17,2
из арахиса	10,4
из табака (семени)	9,5
из горчицы	8,2
из кунжутного семени	7,9
Клещевина	5,2
Льняное семя	4,2
Семена хлопчатника	3,8

Однако получение глутаминовой кислоты из этих белковых материалов обычно нецелесообразно из-за дороговизны и трудностей их предварительной очистки от жиров, крахмала и тому подобных веществ. Проведение гидролиза, а затем выделение глутаминовой кислоты из сложного гидролизата белков также представляет большие трудности. Кроме того, следует иметь в виду, что и кукуруза, и пшеница, и молоко, из которых специальной обработкой выделяются богатые глутаминовой кислотой белки, сами по себе являются ценными пищевыми продуктами.

Хорошим источником для получения глутаминовой кислоты, а также бетаина, являются отходы свеклосахарного производства. Например: меласса, щелок бариевой, стронциевой, известковой, метанол-бензольной сепараций сахара из мелассы и, наконец, паточно-спиртовая барда – отход паточно-спиртовых заводов. В этих продуктах глутаминовая кислота находится, как известно, в основном, в виде своей циклической модификации – пироглутаминовой кислоты, для превращения которой в глутаминовую кислоту необходим кислотный или щелочной гидролиз. Для проведения гидролиза белковых препаратов необходимо провести их экстракцию из растительного материала. Так как немногие растительные белки существуют в природе в почти чистом состоянии, необходимо подобрать подходящие семена овощей в качестве первичного сырья и экстрагировать из них белок с наибольшей возможной чистотой, при этом обычно получается белок 50–75%-ной чистоты в качестве вторичного сырья. В таблице 3 указано содержание глутаминовой кислоты в таких белках и упомянуты типичные процессы, использующиеся для получения этого вторичного сырья.

Таблица 3 – Природное сырье, использующееся в производстве глутаминовой кислоты

Первичное сырье	Типичная обработка	Побочный продукт	Вторичное сырье	Содержание азота в сырье, %	Содержание глутаминовой кислоты, %
1	2	3	4	5	6
Мука	Martin-метод	крахмал	клейковина пшеницы	12	25
Кукуруза	мокрый метод	кукурузный крахмал	клейковина кукурузы	13	20

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
Соевые бобы	экстракция гексаном	соевое масло	обезжиренная соевая масса	8	9
Земляной орех	прессование	масло земляного ореха	мука земляного ореха	10	12
Меласса	Steffen-метод	свекольный сахар	концентр. Steffen-отходы		5–12 (влажный)
Меласса	спиртовая ферментация	спирт	концентр. Vinasse (барда)		10–13 (влажный)

### 2.1.1 Получение *L*-глутаминовой кислоты из клейковины муки

*Хлористоводородная соль глутаминовой кислоты.* Смесь 300 мл концентрированной соляной кислоты и 100 г клейковины кипятят в течение 6 ч с обратным холодильником. По охлаждении раствора до комнатной температуры его обрабатывают 20 г животного угля и фильтруют с отсасыванием через два слоя полотна, покрытых тонким слоем инфузорной земли. Для промывки колбы и осадка берут 15 мл концентрированной соляной кислоты. Светло-желтый фильтрат упаривают в вакууме до 75 мл и оставляют на ночь при минус 8 °С. Выделившиеся кристаллы в количестве от 41 до 44 г отфильтровывают через фильтровальную бумагу.

Неочищенный желтый продукт растворяют в 40 мл горячей воды, обесцвечивают 1 г активированного угля и обрабатывают 33 мл соляной кислоты. После стояния в течение ночи в холодильном шкафу получают первую порцию кристаллов весом около 23 г с  $T_{пл} = 209$  °С (с разл.). При упаривании маточных растворов можно получить еще две порции кристаллов такой же степени чистоты. Общий выход (примечание 1) хлористоводородной соли глутаминовой кислоты удовлетворительного качества составляет 36,7 г.

*L-глутаминовая кислота.* К раствору 36,7 г (0,2 моль) чистой хлористоводородной соли глутаминовой кислоты в 200 мл горячей воды добавляют 18,6 г (0,2 моль) анилина. Реакционную смесь после нагревания в течение нескольких минут на паровой бане охлаждают, обрабатывают 200 мл 95%-ного этилового спирта и оставляют стоять в течение ночи в холодильном шкафу. Кристаллическую глутаминовую

кислоту отфильтровывают и промывают 95%-ным этиловым спиртом до отрицательной пробы на хлор-ион. Полученный продукт совершенно чист и плавится с разложением при 211–213 °С. Выход (примечание 2): от 27 до 28 г (92–95 % от теоретического).

**Примечания:**

1. Выход в значительной степени зависит от качества клейковины. При проверке применялась глютеновая мука, содержащая 8,7 % влаги и 7,4 % азота, в пересчете на сухое вещество.

2. Полученная глутаминовая кислота – высокого качества; это качество не может быть улучшено перекристаллизацией из воды. Такая перекристаллизация ведет только к потерям в результате образования пирролидонкарбоновой кислоты. Маточные растворы не дают уже кристаллического осадка при упаривании их в вакууме до объема 75 мл с последующей обработкой 75 мл спирта.

**2.1.2 Получение *L*-глутаминовой кислоты из технического кератинсодержащего сырья**

Разработана технология комплексного производства аминокислот из технического сырья, в первую очередь кератинсодержащего: рогов, копыт, щетины-шпарки, лобашей, ушей, лопаток кроликов и птицы, пера. При обработке сырья по предлагаемой схеме получают природные аминокислоты *L*-ряда из различного белоксодержащего сырья – глутаминовую кислоту, тирозин, цистин, цистеин, аргинин, гистидин, лизин, лейцин, валин, фенилаланин и комплексамин. Количество интересующей нас глутаминовой кислоты колеблется от 3 до 6 % (в пересчете на сухое вещество).

В основе технологии получения аминокислот лежит кислотный гидролиз сырья. Отсортированное сырье промывают, измельчают и обрабатывают 28%-ной соляной кислотой: на одну весовую часть сырья – одна объемная часть кислоты и такое же количество воды. Гидролиз ведется при температуре от 115 до 120 °С и давлении около 1,5 г/см<sup>2</sup> в течение 4–5 ч. Масса непрерывно перемешивается. Момент окончания гидролиза определяют по отрицательной реакции на белок (ксантопротеиновая реакция). Гидролизат охлаждают до 8–10 °С, после чего отфильтровывают жирные кислоты. Фильтрат разбавляют водой (1:1), очищают активированным углем (5–10 % к объему фильтрата) в течение 1 ч при 60 °С и постоянном перемешивании, после чего смесь отфильтровывают. Очищенный гидролизат упаривается до удельного веса 1,27–1,29. К очищенному и упаренному гидролизату добавляют концентрированную соляную кислоту (25 % к объему). Охлажденная до 1 °С смесь кристаллизуется в течение 24 ч.

Выпавшие кристаллы технического хлоргидрата глутаминовой кислоты отфильтровывают, отжимают и растворяют в воде (1:1) при подогревании до температуры не выше 60 °С и постоянном перемешивании. Полученный раствор очищают при помощи активированного угля, пока он не станет прозрачным с зеленоватым оттенком. Этот раствор нейтрализуют кальцинированной или двууглекислой содой до рН 3,2. Соду берут в количестве 40–50 % к весу выпавших кристаллов хлоргидрата глутаминовой кислоты. Чтобы избежать сильного вспенивания, осаждение глутаминовой кислоты ведут при непрерывном перемешивании и охлаждении 4–5 ч. Осадок отфильтровывают и промывают холодной водой и этиловым спиртом.

Полученную кислоту высушивают в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 60 °С.

### 2.1.3 Получение *L*-глутаминовой кислоты из казеина молока

Белок молока – казеин – относится к подгруппе фосфопротеинов. При его гидролизе соляной кислотой образуется смесь хлоргидратов аминокислот, из которой в первую очередь выделяется хлоргидрат глутаминовой кислоты, после отделения которого в маточном растворе остаются такие ценные аминокислоты, как тирозин, лейцин, серин и другие, выделяемые специальными методами при комплексной переработке гидролизата.

Гидролиз казеина молока ведется двукратным весом 20%-ного раствора HCl при 100 °С. После окончания гидролиза массу охлаждают до 70–80 °С и добавляют 1,5 % (по весу казеина) активированного угля для обесцвечивания гидролизата. Затем гидролизат отфильтровывают от гуминовых веществ и отработанного угля, фильтрат упаривают при 95 °С до удельного веса 1,19, охлаждают, добавляют концентрированную HCl в количестве, необходимом для кристаллизации хлоргидрата глутаминовой кислоты. Процесс кристаллизации при 5 °С идет в течение двух суток.

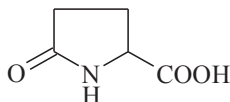
Кристаллы хлоргидрата глутаминовой кислоты растворяют и вновь дважды обрабатывают активированным углем (соответственно 3 и 1,5 % по весу казеина). Чистый раствор хлоргидрата глутаминовой кислоты нейтрализуют насыщенным раствором соды до рН 3,2 (изоэлектрическая точка глутаминовой кислоты). Кристаллизация продолжается 24 ч при температуре +5 °С. Выпавшие кристаллы глутаминовой кислоты отфильтровывают, промывают на фильтре сначала дистиллированной водой, а затем спиртом и эфиром и высушивают при 70 °С.



### 3 ПРОИЗВОДНЫЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

#### 3.1 *L*-Пирролидонкарбоновая кислота

Пирролидонкарбоновая, или 5-оксо-пирролидин-2-карбоновая, или пироглутаминовая кислота, относится к оксо-карбоновым кислотам с тремя кислородными атомами, является лактамом, может также рассматриваться как ангидрид  $\alpha$ -аминоглутаровой или глутаминовой кислоты; имеет молекулярный вес 129.

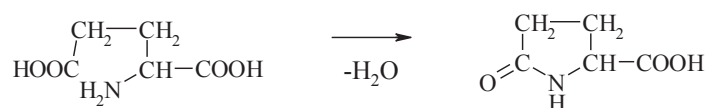


*L*-Пирролидонкарбоновая кислота имеет  $T_{пл} = 162-163$  °С, легко растворима в метаноле и этиловом спирте, очень трудно – в хлороформе, практически нерастворима в эфире и толуоле. При действии сильной кислоты или щелочи она подвергается гидролизу до глутаминовой кислоты.

Пирролидонкарбоновая кислота и ее производные находят применение в медицине, химии и химической технологии. Эта кислота широко используется в фармацевтической промышленности при производстве физиологически активных соединений. Например, в последнее время стало известно применение пирролидонкарбоновой кислоты для получения ее солей с аминами (холином, бетаином, уротропином и др.), которые могут быть использованы для лечения алкоголизма, психических расстройств, депрессий и других заболеваний.

*L*-Пирролидонкарбоновая кислота дополнила собой список соединений, применяемых для разделения аминокислот и их производных на оптические изомеры. С такой целью *L*-пирролидонкарбоновая кислота используется при одном из синтезов лизина. Кроме того, по мнению некоторых исследователей, эта кислота представляет интерес в том отношении, что она образует мост к соединениям, входящим в красящее вещество крови.

#### 3.1.1 Методика получения *L*-пирролидонкарбоновой кислоты

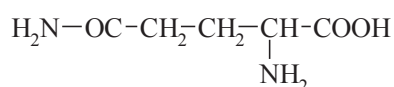


В запаянной трубке нагревают 7 г *L*-глутаминовой кислоты и 7 мл воды до 130 °С и выдерживают при этой температуре 6–8 ч. Лучше всего трубку или ампулу поместить в автоклав. После охлаждения окрашенный в желтый цвет раствор переносят в колбочку и упаривают в вакууме до образования масла. Масло перемешивают шпателем до превращения его в твердую кристаллическую массу. Размельченный продукт растворяют в кипящем диоксане и отфильтровывают трудно-растворимый рацемат. Из фильтрата при охлаждении выпадает желтоватый осадок *L*-пирролидонкарбоновой кислоты; так как кислота легко образует пересыщенный раствор, рекомендуется его перемешивать стеклянной палочкой. Выход около 4,5 г (70 %).

$$T_{пл} = 152–60 \text{ °С}; [\alpha]_D = 9,9^\circ \text{ (в воде).}$$

### 3.2 *L*-глутамин ( $\gamma$ -амид-*L*-глутаминовой кислоты)

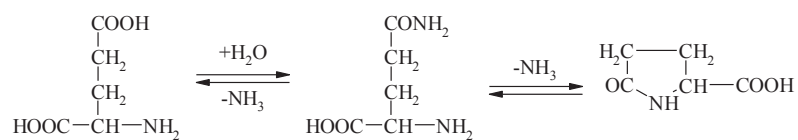
Одним из наиболее распространенных в природе соединений глутаминовой кислоты является ее моноамид – *L*-глутамин, нашедший применение в биохимии, микробиологии, медицинской промышленности.



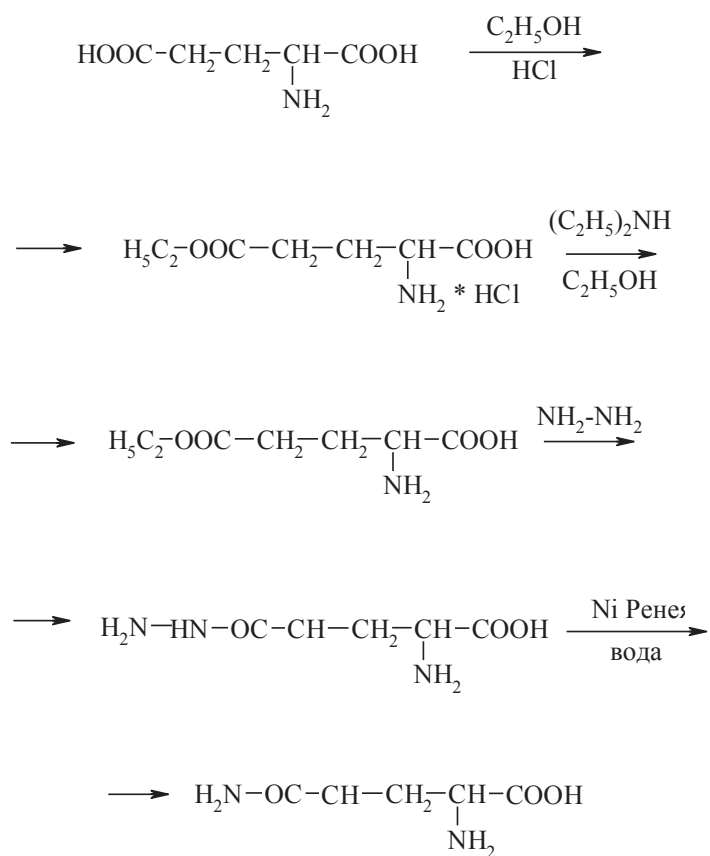
Глутамин в значительных количествах содержится в растительных и животных организмах, причем его содержание в культурных растениях зависит от внесения в почву аммонийных удобрений, кристаллизуется в виде игл из содержащего воду этилового спирта, температура плавления 184–185 °С, растворим в воде, очень слабо растворим в этиловом спирте.

Подобно глутаминовой кислоте, глутамин – оптически активное вещество с удельным вращением  $[\alpha]_D$  в 6%-ном растворе HCl, равным 31,8°, а в водном растворе – от +6,1° и до +7,1°.

Под действием кислот и щелочей происходит гидролиз глутамин с образованием глутаминовой кислоты и аммиака. При нагревании глутамин претерпевает значительные изменения: теряет аммиак и циклизуется, превращаясь в пирролидонкарбоновую кислоту. Этот процесс происходит быстрее, чем циклизация глутаминовой кислоты. В присутствии фосфата калия при pH 6,5 и температуре 100 °С глутамин за 60–90 мин полностью превращается в пирролидонкарбоновую кислоту, тогда как глутаминовая кислота в этих условиях не претерпевает никаких превращений.



Наиболее удобен метод получения *L*-глутамина из *L*-глутаминовой кислоты через  $\gamma$ -*L*-метилглутамат и  $\gamma$ -*L*-глутамингидразид. Выход продукта составляет 28 % в расчете на *L*-глутаминовую кислоту.



**Реактивы:**

- глутаминовая кислота;
- этиловый спирт абсолютный;

- этиловый спирт гидролизный;
- диэтиламин;
- гидразин-гидрат;
- никель-алюминиевый сплав, 98 % (содержание никеля не ниже 27 %);
- диметилглиоксим;
- натр едкий;
- уксусная кислота.

### 3.2.1 Получение $\gamma$ -этилглутамата

В двухлитровой банке с притертой пробкой суспендируют 100 г (0,68 моль) *L*-глутаминовой кислоты в 1000 мл (17,4 моль) абсолютно-го спирта, в котором растворено 60 г (1,64 моль) сухого хлористого водорода; суспензию встряхивают 2 ч на механической качалке.

К спиртовому раствору гидрохлорида  $\gamma$ -этилового эфира глутаминовой кислоты при перемешивании и охлаждении льдом прибавляют раствор 169 мл диэтиламина в 85 мл спирта. Температура реакционной смеси не должна превышать +10 °С; рН среды к концу нейтрализации около 8,5. Затем к реакционной массе приливают 350 мл 96%-ного этилового спирта, встряхивают 1,5 ч на качалке и оставляют на 12 ч в холодильнике.  $\gamma$ -Этилглутамат отфильтровывают на воронке Бюхнера и тщательно отжимают слизистый осадок, который переносят в банку с притертой пробкой и заливают 350 мл 96%-ного спирта. Смесь встряхивают 1 ч на механической качалке. Осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера и вновь переносят в банку с притертой пробкой, заливают 350 мл 96%-ного спирта, встряхивают 1 ч на качалке. Промытый осадок испытывают на содержание ионов хлора, если последние присутствуют, осадок еще раз промывают 96%-ным спиртом.

$\gamma$ -Этилглутамат после отмывания отфильтровывают на воронке Бюхнера и сушат до постоянной массы в вакуум-сушильном шкафу при 60 °С/10–15 мм (осадок можно сушить на воздухе).

Выход эфира равен 100 г, что составляет 84 % от теоретического в расчете на глутаминовую кислоту.  $T_{пл}$  вещества 186 °С;  $[\alpha]_D = 13,6^\circ$ .

### 3.2.2 Получение $\gamma$ -глутамилгидразида

В трехгорлую колбу емкостью 1 л, снабженную мешалкой и термометром, загружают 290 мл (5,4 моль) гидразин-гидрата и при энергичном перемешивании и охлаждении льдом добавляют 200 г

(1,15 моль)  $\gamma$ -этилглутамата с такой скоростью, чтобы температура не поднималась выше 20 °С. Перемешивание продолжают еще 20–30 мин, после чего добавляют 500 мл 96%-ного спирта, и смесь выдерживают в холодильнике 2 ч при 0–10 °С. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают 560 мл 96%-ного спирта и высушивают 10 ч при 65 °С в вакуум-сушильном шкафу.

Выход глутамилгидразида равен 170 г, что составляет 91,2 % в расчете на  $\gamma$ -этилглутамат.  $T_{пл} = 155–156$  °С,  $[\alpha]_D = +7,0^\circ$ .

### 3.2.3 Приготовление никеля Ренея

В трехгорлую колбу емкостью 4 л, снабженную термометром и мешалкой, помещают 570 г едкого натра и 2140 мл дистиллированной воды. В раствор, охлаждаемый льдом до 50 °С, при сильном перемешивании добавляют 317 г никель-алюминиевого сплава небольшими порциями через 3 мин. Температуру реакции поддерживают в пределах 50 °С путем регулирования скорости добавления сплава и интенсивности охлаждения. Смесь при энергичном перемешивании выдерживают 50 мин при температуре 50 °С, при этом обычно баню со льдом заменяют баней с горячей водой. Катализатор немедленно переносят в промывной цилиндр (примечание 1) и отмывают до нейтральной реакции при непрерывной циркуляции тока дистиллированной воды и периодическом включении мешалки.

Промывание должно длиться не более 8 ч, чтобы не понижалась восстановительная активность никеля Ренея.

### 3.2.4 Получение глутамина

В четырехгорлой колбе емкостью 2 л, снабженной мешалкой, термометром и обратным холодильником, нагревают на водяной бане до 80 °С 300 г влажной пасты никеля Ренея (примечание 2) и 600 мл воды, затем добавляют одновременно 300 г (1,86 моль) глутамилгидразида и 75 мл 17%-ного водного раствора гидразина с такой скоростью, чтобы температура в колбе не превышала 80–85 °С. Смесь перемешивают 20 мин, после чего осадок металлического никеля отфильтровывают и промывают 125 мл воды. Фильтрат и промывные воды упаривают до объема 600 мл под вакуумом (50–60 мм) при 45 °С (примечание 3). Полученный раствор нейтрализуют ледяной уксусной кислотой до pH 4,8 и разбавляют 1800 мл 96%-ного этилового спирта.

Смесь охлаждают до 10 °С и оставляют на 12 ч для кристаллизации. Выделившиеся кристаллы *L*-глутамина отфильтровывают и промывают 200 мл 96%-ного этилового спирта.

Получают 270 г *L*-глутамина, загрязненного никелем. Для очистки продукт растворяют при 85 °С в 1200 мл воды и обрабатывают 10 г твердого диметилглиоксима. Осадок красного цвета (комплекс никеля с диметилглиоксимом) отфильтровывают и к фильтрату вновь добавляют 0,5–1 г диметилглиоксима. Отсутствие красного окрашивания указывает на полное удаление ионов никеля из раствора.

В случае образования осадка его отфильтровывают и промывают 20–30 мл воды, фильтрат и промывные воды разбавляют 1800 мл 96%-ного этанола, охлаждают до 10 °С и оставляют на сутки для кристаллизации.

Выпавшие кристаллы *L*-глутамина отфильтровывают, промывают 50 мл 96%-ного этанола и высушивают 3 ч при 75 °С.

Выход *L*-глутамина равен 135 г, что составляет 49,8 % от теоретического (примечание 3).

**Примечания:**

1. Промывной цилиндр снабжен мешалкой и двумя отводами для подачи дистиллированной воды и отсоса ее через насос. Скорость перемешивания регулируют таким образом, чтобы частицы катализатора поднимались не выше 0,75 высоты столба в цилиндре.

2. Для повышения восстановительной способности никеля Ренея его перед употреблением в реакцию следует промыть спиртом.

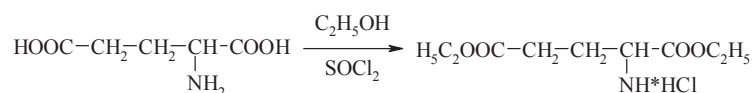
3. При длительном нагревании и более высокой температуре возможно превращение глутамина в аммонийную соль пирролидонкарбонной кислоты, что в конечном итоге снижает выход глутамина.

**3.3 Диэтиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты гидрохлорид**

Диэтиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты широко используется для синтеза аналогов метотрексата, аминокперина и других производных фолиевой кислоты, обладающих биологической активностью. Кроме того, сам эфир обладает психотропными свойствами.

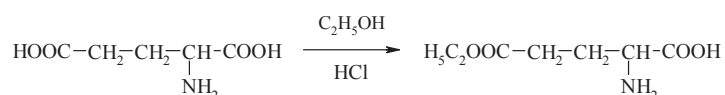
Из-за склонности диэтилового эфира *L*-глутаминовой кислоты, как и эфиров других аминокислот, к превращению в дикетопиперазин при хранении, его получают в виде соли, чаще всего в виде гидрохлорида или *n*-толуолсульфоната.

*Методика получения:*



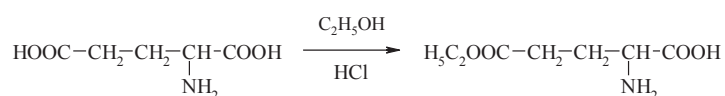
К смеси 25 г (0,17 моль) *L*-глутаминовой кислоты и 200 мл абсолютного этилового спирта при перемешивании медленно добавляют 29 мл (0,41 моль) хлористого тионила, поддерживая температуру в реакционной массе не выше минус 3 °С. Затем реакционную массу нагревают до 65 °С и выдерживают при этой температуре и перемешивании в течение 4 ч. Из реакционной массы отгоняют смесь этилового спирта с хлористым тионилем при пониженном давлении, остаток переосаждают из этанола эфиром или перекристаллизовывают из этилацетата. Выход гидрохлорида диэтилового эфира *L*-глутаминовой кислоты составляет 36,67 г (90,1 %) при переосаждении или 31,9 г (78,4 %) при перекристаллизации из этилацетата. Продукт получают в виде бесцветных игл.  $T_{пл} = 112-114$  °С (из этилацетата);  $[\alpha]_D = +22,0^\circ$  (вода).

### 3.4 $\gamma$ -Этил-*L*-глутамат



Суспензию 35 г (0,24 моль) *L*-глутаминовой кислоты в 350 мл абсолютного этанола, содержащую 25 г (0,63 моль) сухого хлористого водорода, встряхивают до полного растворения осадка 20 мин. Раствор разбавляют абсолютным этанолом до объема 1 л и по каплям добавляют триэтиламин до щелочной реакции. После стояния смеси при 0 °С в течение 16 ч продукт реакции отфильтровывают, промывают холодным абсолютным этанолом, эфиром и высушивают на воздухе, а затем в вакууме; выход составляет 29 г (70 %). Вещество после перекристаллизации из водного раствора спирта плавится при 194 °С.

### 3.5 $\gamma$ -Метил-*L*-глутамат



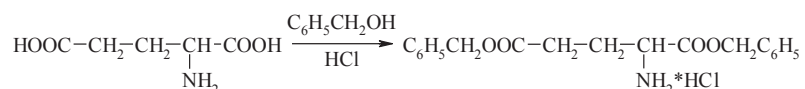
К охлажденному раствору 20 мл хлористого тионила в 140 мл метанола добавляют 30 г *L*-глутаминовой кислоты и смесь интенсивно встряхивают в течение нескольких минут до растворения большей части осадка. Затем реакционную смесь оставляют на 25 мин при 20 °С и добавляют к ней 400 мл эфира. Осадок хлоргидрата  $\gamma$ -метил-*L*-

глутамата отфильтровывают, промывают эфиром и высушивают в вакууме над гранулированным едким натром; выход 24 г (60 % от теоретического),  $T_{пл} = 154^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6 Хлоргидрат дибензилового эфира *L*-глутаминовой кислоты

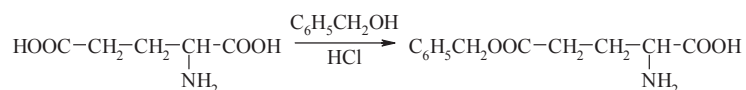
Использование бензиловых эфиров в синтетической пептидной химии дает некоторые преимущества по сравнению с соответствующими метиловыми или этиловыми эфирами из-за устранения омыления щелочью в конечной стадии пептидного синтеза. Кроме того, бензиловые эфиры оказываются весьма ценными в тех случаях, когда необходимо устранить обработку щелочами, особенно при использовании таких лабильных к щелочам ацильных защитных групп, как фталильная и трифторацетильная. Бензиловые эфиры можно удалять одновременно с карбобензоксигруппой путем каталитического гидролиза при использовании *N*-карбобензоксипроизводных.

*Методика получения:*



Суспензию 10 г (0,068 моль) *L*-глутаминовой кислоты в 150 мл бензинового спирта нагревают до  $55^{\circ}\text{C}$  и в нее при перемешивании мешалкой пропускают в течение часа ток сухого хлористого водорода, причем температура реакционной смеси постепенно повышается. Смесь переносят в прибор для вакуумной перегонки, добавляют 75 мл бензола и раствор концентрируют в вакууме при температуре бани около  $40^{\circ}\text{C}$ ; остаток выдерживают в вакууме (приблизительно 10 мм) еще 1 ч при температуре бани  $85^{\circ}\text{C}$ , и смесь вновь насыщают в течение часа сухим хлористым водородом. Остаток осаждают эфиром (5–7 объемами) и перекристаллизовывают из смеси метанола с эфиром. Выход чистого хлоргидрата дибензил-*L*-глутамата составляет 15 г (61 %);  $T_{пл} = 100\text{--}102^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_D = +9,4^{\circ}$  (1,5 %, в 0,1 Н НСl).

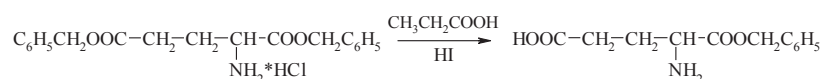
### 3.7 $\gamma$ -Бензил-*L*-глутамат





Смесь 147 г *L*-глутаминовой кислоты, 250 мл концентрированной соляной кислоты и 1 л бензилового спирта нагревают при перемешивании в круглодонной колбе на кипящей водяной бане до полного растворения осадка (обычно на это требуется 40–60 мин). Еще через 10 мин реакционную смесь охлаждают в бане со льдом, добавляют к ней 8 л эфира, вновь выдерживают 30 мин при 0 °С и фильтруют. Осадок растворяют в 1200 мл холодной воды, рН раствора доводят до 6,0–6,5 путём добавления гидроокиси лития, смесь охлаждают 2 ч в бане со льдом и вновь фильтруют. Осадок промывают этанолом до отрицательной реакции на хлор-ион (проба с нитратом серебра) и затем эфиром. После перекристаллизации из примерно 800 мл кипящей воды получают 30–40 % чистого  $\gamma$ -бензил-*L*-глутамата.

### 3.8 $\alpha$ -Бензил-*L*-глутамат



Хлоргидрат дибензил-*L*-глутамата (10 г) растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты, к раствору добавляют 10 мл (0,12 моль) постоянно кипящей йодистоводородной кислоты (удельный вес 1,7), и смесь оставляют на 5,5 ч при 50 °С. Реакционную массу концентрируют в вакууме, к оставшемуся маслу добавляют 50 мл бензола и затем растворитель отгоняют в вакууме; эту операцию повторяют еще дважды. Коричневый сиропобразный остаток растворяют при минус 10 °С в 60 мл 95%-ного этанола, содержащего 7 мл (0,029 моль) три-*n*-бутиламина, и к раствору добавляют ещё 3 мл три-*n*-бутиламина до рН около 7; при этом начинается кристаллизация продукта реакции. Реакционную массу оставляют в холодильнике на ночь, осадок отфильтровывают и тщательно промывают абсолютным этанолом и эфиром; получают 5,7 г кристаллического вещества. Кристаллы растворяют при комнатной температуре в 11 мл воды, содержащей 0,034 моль HCl, раствор обесцвечивают путем нагревания с активированным углем и добавляют к нему равный объем абсолютного этанола. После нейтрализации раствора три-*n*-бутиламином выпадает кристаллический осадок; смесь выдерживают при 0 °С в течение нескольких часов и затем фильтруют. Выход 4,3 г (67 %),  $T_{\text{пл}} = 147\text{--}148$  °С,  $[\alpha]_D = +12,2^\circ$  (2,9 %, в 0,1 Н HCl).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аймухамедов, Г.Б. Значение и методы получения глутаминовой кислоты, бетаина и их производных / Г.Б. Аймухамедов, К.П. Захаров. – Фрунзе: Издательство Академии наук Киргизской ССР, 1962. – 139 с.
2. Жушман, А.И. Производство и применение глутаминовой кислоты и глутамата натрия / А.И. Жушман. – М.: ЦИНТИПищепрома, 1965. – 44 с.
3. Аймухамедова, Г.Б. Пирролидонкарбоновая кислота / Г.Б. Аймухамедова, Е.П. Рукавишникова. – Фрунзе: Илим, 1974. – 105 с.
4. Чефранов, И.В. Производство глутаминовой кислоты и глутамата натрия на сахарных заводах / И.В. Чефранов. – М.: ЦИНТИПищепрома, 1965. – 66 с.
5. Кац, В.М. Определение содержания глутаминовой кислоты в мелассе / В.М. Кац, Л.К. Иванова. – М.: ЦИНТИПищепрома, 1963. – 28 с.
6. Скирстымонский, А.И. Производство глутаминовой кислоты и ацидина / А.И. Скирстымонский. – Киев: УкрНИИНТИ, 1968. – 39 с.
7. Лазурьевский, Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазурьевский, И.В. Терентьева, А.А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1966. – 224 с.
8. Гринштейн, Дж. Химия аминокислот и пептидов / Дж. Гринштейн, М. Виниц. – М.: Мир, 1965. – 822 с.
9. Синтезы органических препаратов. Сб. 1, – М.: ИЛ, 1949. – 172 с.
10. Нечаев, А.П. Пищевые добавки / А.П. Нечаев, А.А. Кочеткова, А.Н. Зайцев. – М.: Колос, 2001. – 255 с.
11. Жданова, Е.В. Способ получения гидрохлорида диэтилового эфира *L*-глутаминовой кислоты / Е.В. Жданова, И.А. Прокопьева, Л.В. Алексеева // Хим.-фарм. журнал. 1984. – № 11. – С. 1387–1388.

*Учебное издание*

**Аверьянова Елена Витальевна**  
**Севодин Валерий Павлович**

**СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ**

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ  
для студентов направлений подготовки 19.03.01 «Биотехнология»,  
19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья»  
и магистрантов направления подготовки  
19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья»

Редактор Малыгина И.В.  
Технический редактор Богомолова О.А.

Подписано в печать 24.03.15. Формат 60×84 1/16.  
Усл. п. л. 1,60. Тираж 30 экз. Заказ 2015-37.  
Печать – ризография, множительно-копировальный  
аппарат «RISO EZ300».

Издательство Алтайского государственного  
технического университета им. И.И. Ползунова.  
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46.

Оригинал-макет подготовлен ИИО БТИ АлтГТУ.  
Отпечатано в ИИО БТИ АлтГТУ.  
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27.